



# Ascite, insuffisance surrénale et inflammation systémique au cours de la cirrhose : mécanismes, diagnostic et conséquences pronostiques

Thierry Thevenot Thévenot

## ► To cite this version:

Thierry Thevenot Thévenot. Ascite, insuffisance surrénale et inflammation systémique au cours de la cirrhose : mécanismes, diagnostic et conséquences pronostiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Franche-Comté, 2011. Français. NNT : 2011BESA3005 . tel-01228630

**HAL Id: tel-01228630**

**<https://theses.hal.science/tel-01228630>**

Submitted on 13 Nov 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

## ECOLE DOCTORALE « HOMME – ENVIRONNEMENT – SANTE »

Thèse en vue de l'obtention du titre de  
Docteur de l'université de Franche-Comté

ASCITE, INSUFFISANCE SURRENALE ET INFLAMMATION  
SYSTEMIQUE AU COURS DE LA CIRRHOSE : MECANISMES,  
DIAGNOSTIC ET CONSEQUENCES PRONOSTIQUES

Présentée et soutenue publiquement par

Thierry THEVENOT

Le 28 novembre 2011

*Sous la direction de M<sup>r</sup> le Professeur Vincent Di Martino*

Membres du Jury :

Vincent DI MARTINO, Professeur à l'université de Franche-Comté

Patrick HILLON, Professeur à l'université de Dijon

Jacques REGNARD, Professeur à l'université de Franche-Comté

Jean Pierre VINEL, Professeur à l'université de Toulouse, Rapporteur

Richard MOREAU, Directeur de recherche à l'université Paris VII, Rapporteur

*A Marie-Christine, pour son soutien permanent*

*A Elodie et Céline, mes enfants*

*A mes parents, qui m'ont permis de poursuivre mes études*

*A toute l'équipe du Pr Di MARTINO, sincères remerciements aux Drs CERVONI J.P., RICHOU C. et VANLEMMENS C. pour leur soutien*

*Merci au Dr ALBY B., Chef de Clinique Assistant, qui m'a épaulé avec brio et enthousiasme*

*Merci à Mr Claude De Vettor et à Mme Frances Sheppard pour leur disponibilité et leur aide logistique*

*Merci au Dr Laurence Dolomie (Service de Médecine Nucléaire, CHU de Bordeaux) pour son aide à la présentation des résultats concernant les méthodes de dosage du cortisol libre.*



*Je tiens à remercier*

*M. le Pr Vincent DI MARTINO, qui m'a fait l'honneur de diriger cette thèse et qui m'a permis de développer mes travaux*

*M. le Pr Jean Pierre VINEL et le Dr Richard MOREAU, qui ont accepté d'être rapporteur de cette thèse. Nul doute que de futures collaborations dans le domaine de l'hypertension portale entre les centres de Toulouse, de Beaujon et de Besançon viendront compléter, je l'espère, nos travaux en commun.*

*M. le Pr Patrick HILLON, qui a eu la sympathie d'accepter de participer au jury de cette thèse et d'entretenir ainsi des liens d'amitié et de collaboration entre Besançon et Dijon*

*M. le Pr Jacques REGNARD, qui m'a fait l'honneur et l'amitié de participer au jury de cette thèse. Des perspectives de recherche sur les complications pulmonaires de la cirrhose viendront compléter, je l'espère, nos travaux actuels*

# Résumé

La prévalence de la cirrhose et ses complications risque d'augmenter ces prochaines années, conséquence du vieillissement de la population et de l'augmentation du syndrome dysmétabolique, qui constitue à lui seul une étiologie grandissante de la cirrhose et aggrave les autres causes de cirrhose. Malgré de nombreux progrès dans la prise en charge des complications de la cirrhose, son histoire naturelle reste encore marquée par un taux de mortalité préoccupant. Nos travaux, résolument pragmatiques, ont cherché à améliorer l'état des connaissances de l'histoire naturelle et la prise en charge clinique des malades cirrhotiques à travers trois aspects : 1) la prise en charge de l'ascite, 2) la prise en compte de l'inflammation systémique dans le pronostic, et 3) l'identification de la dysfonction surrénale possiblement associée à la cirrhose. Les traitements de première intention de l'ascite associent les diurétiques et les ponctions évacuatrices. La ponction d'ascite est généralement considérée comme un geste sûr aux complications exceptionnelles mais cela méritait d'être confirmé par une analyse systématique. Notre premier travail a fourni la description des complications mineures et majeures de la paracentèse à travers l'analyse prospective de 515 paracentèses obtenues chez 171 patients cirrhotiques. Le taux de complications mineures et majeures (respectivement de 8,9% et 1,6%) n'était pas négligeable. Le principal facteur de risque de complication majeure était le recours à une paracentèse évacuatrice (vs. exploratrice), tandis que l'étiologie alcoolique, la gravité de la cirrhose (Child-Pugh C) et l'intensité de la thrombopénie rendaient plus compte des complications mineures. Notre second travail a concerné le diagnostic de l'infection spontanée du liquide d'ascite (ISLA), qui constitue une complication redoutable et dont le diagnostic cytologique n'est pas toujours réalisable dans l'urgence. Dans une première étude monocentrique analysant 100 paracentèses, nous avons testé la performance de deux bandelettes urinaires (BU) pour le diagnostic de l'ISLA. Les performances observées étaient excellentes, caractérisées par une sensibilité à 89%, une spécificité à 100%, une VPP à 100% et une VPN à 99%. Ces résultats encourageants n'ont toutefois pas été confirmés par l'étude multicentrique française de référence sur le sujet, ayant étudié 2123 paracentèses. En utilisant le seuil de 125 leucocytes/mm<sup>3</sup>, les performances de la BU Multistix 8SG<sup>®</sup> affichaient une excellente spécificité (99,2%) et une excellente VPN (96,9%), mais une sensibilité (45,3%) et une VPP (77,9%) décevantes. La conséquence pragmatique de cette étude a été l'abandon de la BU dans la pratique clinique faisant du diagnostic cytologique la seule méthode fiable pour le diagnostic d'ISLA. Notre 3<sup>ème</sup> travail concerne l'évaluation du pronostic des patients cirrhotiques sévères, destinée à mieux identifier les candidats à la transplantation hépatique que ne le font les scores de MELD ou de Child-Pugh. Pour ce faire, nous avons eu l'idée de prendre en compte l'existence d'une inflammation systémique (SRIS) en analysant l'impact pronostique de la simple mesure de la C-réactive protéine (CRP). Nous avons ainsi analysé la performance de la CRP pour prédire la survie chez 175 patients cirrhotiques sévères (Child-

Pugh >7) hospitalisés, en définissant 3 groupes de patients selon l'évolution du taux de CRP [groupe A (n=47): CRP  $\geq$  29 mg/L à J0 et à J15 ; groupe B (n=33): CRP  $\geq$  29 mg/L à J0 et CRP < 29 mg/L à J15 ; et groupe C (n=88): CRP < 29 mg/L à J0]. Les taux de survie à 6 mois étaient très différents entre les patients du groupe A (40,3%) et ceux des groupes B et C (66,8%, et 75,3% respectivement). En analyse multivariée, la mortalité à 6 mois étaient prédite par le MELD (HR:1,04; IC95%:1,00-1,08 ; p=0,037), l'existence de comorbidités extra-hépatiques (HR=1,87; IC95%:1,04-3,36; p=0,036) ou d'un carcinome hépatocellulaire (HR=2,28; IC95%:1,17-4,42; p=0,015), et l'appartenance au groupe A (HR=2,25; IC95%:1,25-4,07; p=0,007). La CRP permet donc d'améliorer significativement l'évaluation pronostique des patients cirrhotiques par rapport au MELD et pourrait être incorporée dans un nouveau score « MELD-CRP ». Un autre facteur susceptible d'aggraver le pronostic est l'insuffisance surrénale, que la littérature récente suspecte d'être fréquente au cours de la cirrhose. Nous avons évalué la fonction surrénale chez 95 patients non infectés (34 Child-Pugh A, 29B et 32C) et 30 infectés (Child-Pugh >8) à l'aide des tests au Synacthène à 250  $\mu$ g et à 1 $\mu$ g (ce dernier étant réalisé uniquement chez les 95 patients non infectés). Nous avons montré que les concentrations de cortisol *total* sérique (CTS) diminuaient avec la dégradation de la fonction hépatique alors que les concentrations du cortisol *libre* sérique (CLS) et du cortisol salivaire augmentaient ; cette chute du CTS était en rapport avec une chute des concentrations des protéines porteuses du cortisol [albumine et cortisol binding protein (CBG)] produites par le foie. Contrairement aux idées reçues, nous avons montré que les patients décédés à 12 mois avaient des concentrations du CLS plus élevées au moment du test au Synacthène à 1 $\mu$ g, remettant en cause le concept de syndrome « hépto-surrénalien ». Cette augmentation du CLS chez les patients cirrhotiques les plus graves était probablement liée à des phénomènes de translocation bactérienne entraînant un « stress » inflammatoire. Le cortisol libre est l'hormone biologiquement active qu'il faudrait pouvoir doser en routine mais cela n'est pas encore d'actualité. Nos derniers travaux ont cherché à définir la meilleure méthode d'estimation indirecte du CLS. La formule de Coolens s'est avérée décevante en sous-estimant la concentration du CLS en cas d'hypoalbuminémie. En revanche, l'équation cubique de Dorin, qui prend en compte la concentration d'albumine et de CBG, affichait des performances intéressantes.

Bien des défis restent encore à relever pour améliorer la prise en charge et la qualité de vie des patients cirrhotiques les plus graves. Nos résultats indiquent que l'insuffisance surrénale n'est pas une complication habituelle de la cirrhose, et qu'il n'existe pas de place pour un traitement corticoïde substitutif chez le patient cirrhotique hémodynamiquement stable. Au contraire, on observe une augmentation du cortisol libre et de l'inflammation systémique, vraisemblablement liées entre-elles, qui exercent un impact direct sur le pronostic. Les corticoïdes pourraient par conséquent être discutés pour leurs propriétés anti-inflammatoires chez le patient cirrhotique atteint de SRIS, de sepsis sévère ou de choc septique, mais leur intérêt clinique reste à démontrer.

# Abstract

The prevalence of cirrhosis and its complications will probably increase in the near future, due to the ageing population and the growing incidence of metabolic syndrome, that is in itself a frequent aetiology of cirrhosis and worsens other causes of cirrhosis. Despite major progress in the management of cirrhosis and its complications, the natural history remains marked by worrying mortality rates. Our clinical research aimed to improve our understanding of the natural history and the care of cirrhotic patients in three ways: 1) managing ascitis, 2) taking into account the systemic inflammation in the prognostic assessment, and 3) identifying the adrenal dysfunction, that may be associated with cirrhosis. The first-line treatments of ascitis include diuretics and paracentesis. Paracentesis is generally considered as safe because complications are extremely rare, but this should be confirmed by a systematic analysis. Our first study provided a description of the minor and major complications of paracentesis through a prospective analysis of 515 paracentesis obtained from 171 cirrhotic patients. The rate of minor and major complications (8.9% and 1.6%, respectively) was not negligible. The main risk factor for a major complication was therapeutic (vs. diagnostic) paracentesis, whereas the aetiology related to alcohol, the severity of cirrhosis (Child-Pugh C) and the intensity of thrombopenia were associated with minor complications. Our second work concerns the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis (SBP), a life-threatening complication, whose cytological diagnosis is difficult to perform in an emergency. In a first single center study analyzing 100 paracentesis, we tested the performance of two urinary strips for the diagnosis of SBP. The performances observed were excellent: sensitivity was 89%, specificity was 100%, PPV was 100% and NPV was 99%. These encouraging results were not confirmed by the French multicenter landmark study on the topic, that studied 2123 paracentesis. Using the cut-off of 125 leukocytes/mm<sup>3</sup>, the performances of Multistix 8SG® displayed excellent specificity (99.2%) and excellent NPV (96.9%), but sensitivity (45.3%) and PPV (77.9%) were disappointing. The pragmatic consequence of this study was the discarding of strips in clinical practice, making the cytological diagnosis the only reliable method for diagnosing SBP. Our 3<sup>rd</sup> study focused on the prognosis assessment of patients with severe cirrhosis, intended to identify candidates for liver transplantation more effectively than MELD and Child-Pugh scores. It occurred to us to take into account presence of systemic inflammation (SIRS) by analyzing the prognostic impact of simple C-reactive protein (CRP) measurement. We thus analyzed the performance of CRP to predict survival in 174 severe cirrhotic inpatients (Child-Pugh >B8), defining 3 groups of patients according to CRP level within the first 15 days [group A (n=47): CRP >29 mg/L at D0 and D15; group B (n=33): CRP >29 mg/L at D0 and CRP < 29 mg/L at D15; and C (n=88) group C: CRP < 29 mg/L at D0]. The 6-month survival rates were very different between group A patients (40.3%) and group B and C patients (66.8%, and 75.3%, respectively). By multivariate analysis, 6-month mortality was predicted by MELD score (HR:1.04; 95%CIHR:1.00-1.08 ; p=0.037), extra-hepatic comorbidities

(HR=1.87; 95%CI:1.04-3.36; p=0.036), hepatocellular carcinoma (HR=2.28; 95%CI:1.17-4.42; p=0.015), and group A (HR=2.25; 95%CI:1.25-4.07; p=0.007). CRP significantly improves compared to MELD the prognostic assessment of cirrhotic patients and therefore could be included in a new « MELD-CRP » score. Another factor likely to worsen prognosis is adrenal insufficiency, that recent literature suspects of being common in the event of cirrhosis. We evaluated adrenal function in 95 non-infected patients (34 Child-Pugh A, 29 B and 32 C) and 30 infected patients (Child-Pugh > B8) using a standard-dose (250 µg) and a low-dose (1µg) short synacthen test (only in 95 non-infected patients). Our results clearly demonstrated that concentrations of serum total cortisol (STC) decreased along with the alteration of hepatic function while the concentrations of serum free cortisol (SFC) and salivary cortisol increased. The low concentrations of STC in these patients were related to reduced serum concentrations of cortisol-binding proteins [albumin and corticosteroid-binding globulin (CBG)], both synthesized in the liver. Unlike previously reported, we have shown that patients who died at 12 months had high levels of SFC after 1µg of Synacthen, challenging the concept of “hepatoadrenal syndrome”. The increased levels of SFC in the sickest cirrhotic patients were probably related to bacterial translocation inducing inflammatory “stress”. Free cortisol is the biologically active and the most relevant hormone to measure in the setting of cirrhosis. However, SFC cannot currently be obtained routinely. Simpler estimates are proposed, as the Coolens’ or the Dorin’ equation. Our data demonstrates that Coolens’ equation underestimated free cortisol, especially in patients with low albumin levels, in contrast to Dorins’ cubic solution. A lot of challenges remain to be overcome to improve the life expectancy and the quality of life of patients with the most severe cirrhosis. Our results show that adrenal insufficiency is not a usual complication of cirrhosis, and there is no room for a substitute corticoid treatment in hemodynamically stable cirrhotic patients. On the contrary, we observe an increase in free cortisol and systemic inflammation, clearly interrelated, that have a direct influence on prognosis. Corticoids may therefore be considered for their anti-inflammatory properties in cirrhotic patient suffering from SIRS, severe sepsis or septic shock, but their clinical benefits remain to be proven.

# Sommaire

Liste des publications de la thèse .....	11
Abréviations .....	12
Chapitre 1 : INTRODUCTION GENERALE.....	13
1.1) Etat de la question et enjeux .....	13
1.2) Buts et cheminements du travail sur l'ascite et le cortisol.....	14
Chapitre 2 : ETAT DES CONNAISSANCES .....	20
2.1) La surrénale.....	20
2.1.1) Anatomie.....	20
2.1.2) Régulation de l'axe corticotrope .....	21
2.1.3) Rôle physiologique du cortisol .....	24
2.1.4) Etiologie des insuffisances surrénales .....	25
2.1.5) Symptômes et signes cliniques .....	27
2.1.6) Signes biologiques .....	29
2.1.7) Le diagnostic de l'insuffisance cortico-surrénale .....	29
2.1.8) Les dosages hormonaux et tests de stimulation .....	30
2.1.8.1) Hypoglycémie induite par l'insuline .....	30
2.1.8.2) Test à la métopirone.....	31
2.1.8.3) Test à la CRH .....	32
2.1.8.4) Test au Synacthène .....	32
2.1.9) Intérêt de la mesure du cortisol libre.....	37
2.1.9.1) La CBG ou transcortine .....	37
2.1.9.2) Le cortisol libre sérique .....	38
2.1.9.3) Le cortisol salivaire.....	40
2.1.10) Estimateurs du cortisol libre sérique.....	44
2.1.10.1) Index du cortisol libre sérique .....	44
2.1.10.2) Equation quadratique de Coolens et al. ....	45
2.1.10.3) Equation cubique de Dorin et al. ....	47
2.1.11) Cortisol et 11-bêta-hydroxy-stéroïde-déshydrogénase .....	48

2.1.12) Corticoïdes et sepsis.....	50
2.1.12.1) Le cortisol au cours du stress.....	50
2.1.12.2) Evaluation de l'axe HHS durant le stress .....	52
2.1.12.3) Histoire de l'utilisation des corticoïdes au cours du sepsis .....	54
2.2) Maladie du foie et insuffisance surrénale .....	57
2.2.1) Hépatite aiguë et insuffisance surrénale .....	57
2.2.2) Cirrhose et insuffisance surrénale.....	61
2.2.2.1) Physiopathologie de l'insuffisance surrénale au cours de la cirrhose .....	61
2.2.2.2) Prévalence de l'insuffisance surrénale au cours de la cirrhose.....	63
2.2.2.3) Patients cirrhotiques stables évalué avec le test à 250 µg .....	67
2.2.2.4) Patients cirrhotiques stables évalués avec le test à 1 µg.....	70
2.2.2.5) Patients cirrhotiques en situation de stress évalués avec le test à 250 µg .....	71
2.2.2.6) Dosage du cortisol salivaire dans la cirrhose.....	76
<b>Chapitre 3 : CONTRIBUTION PERSONNELLE .....</b>	<b>79</b>
3.1) Article 1 .....	80
3.2) Article 2 .....	90
3.3) Article 3 .....	99
3.4) Article 4 .....	110
3.5) Article 5 .....	114
3.6) Article 6 .....	121
3.7) Article 7 .....	135
<b>Chapitre 4 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>167</b>
4.1) L'ascite : paracentèse, diagnostic d'ISLA et inflammation systémique.....	167
4.2) Cirrhose et insuffisance surrénale .....	170
<b>Chapitre 5 : BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>175</b>
<b>Chapitre 6 : LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX .....</b>	<b>198</b>
6.1) Listes des figures.....	198
6.2) Listes des tableaux .....	199

# Liste des publications de la thèse

Les travaux commentés dans cette thèse concernent les publications suivantes :

## Article 1 –

De Gottardi, **Thevenot T**, Spahr L, Morard I, Bresson-Hadni S, Torres F, Giostra E, Hadengue A. Risk of complications after abdominal paracentesis in cirrhotic patients : a prospective study. Clin Gastroenterol Hepatol 2009;7:906-9.

## Article 2 –

**Thevenot T**, Cadranet JF, Nguyen-Khac E, Tilmant L, Tiry C, Welty S, Merzoug N. Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients by use of two reagent strips. Eur J Gastroenterol Hepatol 2004;6:579-83.

## Article 3 –

Nousbaum JB, Cadranet JF, Nahon P, Nguyen Khac E, Moreau R, **Thevenot T**, Silvain C, Bureau C, Nouel O, Pilette C, Paupard T, Vanbiervliet G, Oberti F, Davion T, Jouannaud V, Roche B, Bernard PH, Beaulieu S, Danne O, Thabut D, Chagneau-Derrode C, de Lédighen V, Mathurin P, Pauwels A, Bronowicki JP, Habersetzer F, Abergel A, Audigier JC, Sapey T, Grangé JD, Tran A; Club Francophone pour l'Etude de l'Hypertension Portale; Association Nationale des Hépto-Gastroentérologues des Hôpitaux Généraux de France. Diagnostic accuracy of the Multistix 8 SG® reagent strip in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. Hepatology 2007;45:1275-1281.

## Article 4 –

Cervoni JP, **Thevenot T**, Weil D, Muel E, Barbot O, Sheppard F, Monnet E, Di Martino V. C-reactive protein predicts short-term mortality in patients with end-stage liver disease. Soumis à J Hepatol.

## Article 5 –

**Thevenot T**, Borot S, Remy-Martin A, Sapin R, Penfornis A, Di Martino V, Monnet E. Assessing adrenal function in cirrhotic patients: is there a reliable test? Gastroenterol Clin Biol 2009;33:584-8.

## Article 6 –

**Thevenot T**, Borot S, Remy-Martin A, Sapin R, Cervoni JP, Richou C, Vanlemmens C, Cleau D, Muel E, Minello A, Tirziu S, Penfornis A, Di Martino V, Monnet E. Assessment of adrenal function in cirrhotic patients using concentration of serum free and salivary cortisol. Liver Int 2011 31:425-33.

## Article 7 –

**Thevenot T**, Dorin RI, Qualls C, Sapin R, Grandclement E, Borot S, Weil D, Monnet E, Di Martino V, Kazlauskaitė R. Higher serum free cortisol levels predict mortality in haemodynamically stable cirrhotic patients. Soumis à J Hepatol.



# Abréviations

ACTH	adrenocorticotrophic hormone
ALAT	alanine aminotransférase
AVP	arginine vasopressine
BU	bandelettes urinaires
CBG	cortisol binding protein
CIVD	coagulation intravasculaire disséminée
CRP	protéine C réactive
CRH	corticotropin-releasing hormone
DHEA	déhydroépiandrostérone
HDL	high density lipoprotein
FNA	facteur natriurétique auriculaire
HHS	hypothalamo-hypophysaire-surrénalien
11 $\beta$ -HSD	11-bêta-hydroxy-stéroïde-déshydrogénase
ICL	index de cortisol libre
IL	interleukine
ISLA	infection spontanée du liquide d'ascite
IV	intravein(eux, se)
LDL	low density lipoprotein
MBL	Mannose-binding lectin
NAFLD	non alcoholic fatty liver disease
NO	nitric oxide (monoxyde d'azote)
NOD	nucleotide-binding oligomerisation domain
PNN	polynucléaires neutrophiles
SRIS	syndrome de réponse inflammatoire et systémique
TLR	<i>toll-like</i> récepteurs
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
TA	tension artérielle
TP	taux de prothrombine
VPN	valeur prédictive négative
VPP	valeur prédictive positive

# Chapitre 1 : INTRODUCTION

## GENERALE

### 1.1) Etat de la question et enjeux

La cirrhose hépatique, quelle que soit sa cause, a un impact certain sur les dépenses de santé. En France, sa prévalence est estimée entre 2000 et 3300 cas/million d'habitants [211]. Au Royaume-Uni, l'incidence de la cirrhose a augmenté de 45% entre 1992 et 2001 et la prévalence a augmenté de 68% [120]. Dans le monde, environ 150000 personnes décèdent chaque année de cirrhose. En 1997, aux USA, la cirrhose était la 10<sup>ème</sup> cause de décès, avec 25000 morts par an. L'estimation de la mortalité annuelle pour 100 000 habitants était de 13,8 entre 2000 et 2002 en France [56]. Les causes les plus fréquentes de cirrhose sont représentées par l'alcool, l'hépatite chronique virale C et la stéatopathie métabolique. Ces hépatopathies stéatosiques non alcooliques sont la conséquence d'une insulino-résistance associée le plus souvent à une obésité, un diabète ou une dyslipidémie. Son incidence a augmentée rapidement en France parallèlement à la prévalence de l'obésité qui était de 8,5% en 1997 et de 14,5% en 2009 (enquête française ObEpi). Ces hépatopathies dysmétaboliques seraient responsables de 30 à 70% des cas de cirrhoses cryptogéniques [67]. Avec le vieillissement de la population, de nouveaux cas de cirrhose vont être diagnostiqués, soit fortuitement à l'occasion d'une échographie ou d'examen biologiques de routine réalisés pour des raisons diverses, soit à l'occasion d'une complication de cette cirrhose méconnue. Les complications de la cirrhose, regroupées communément sous le terme « décompensation », sont les suivantes :

- Hémorragie digestive par rupture de varices oesophagiennes ou gastriques,
- Apparition d'une ascite avec ou sans hydrothorax,
- Ictère,
- Encéphalopathie hépatique,
- Syndrome hépato-rénal.
- Syndrome hépato-pulmonaire et l'hypertension porto-pulmonaire [293, 294]

Enfin, le carcinome hépatocellulaire représente une complication redoutable avec une incidence de 3 à 7% par an après la constitution de la cirrhose. Malheureusement, notre

expérience bisontine a montré que le dépistage de ce cancer reste insuffisant malgré les recommandations de la HAS puisque seuls 42% des carcinomes hépatocellulaires vus dans notre service entre 2004 et 2006 avaient été diagnostiqués suite à un dépistage [104].

Près de 40% des sujets cirrhotiques ont une maladie compensée, asymptomatique, qui dure de 1 à 10 ans. Après la première décompensation, le taux de mortalité est d'environ 10% par an [211]. Mieux connaître l'histoire naturelle de la cirrhose et mieux anticiper le risque de survenue des complications de la cirrhose, est un enjeu important pour la stratégie de prise en charge de ces patients. Avec l'équipe de Bordeaux, nous participons à la constitution d'une cohorte de patients atteints d'une maladie hépatique chronique alcoolique et/ou métabolique compensée, suivis de façon prospective, pour identifier les facteurs associés à la survenue des principales complications cliniques. Durant ces 20 dernières années, la survie des patients cirrhotiques s'est améliorée du fait de l'utilisation plus systématique de l'antibioprophylaxie de l'infection du liquide d'ascite et l'hémorragie digestive [2], de l'utilisation plus intensive des techniques endoscopiques [70], de l'amélioration à court terme des hépatites alcooliques aiguës sévères [214] mais probablement aussi par le dépistage plus précoce des infections (surtout l'infection spontanée du liquide d'ascite (ISLA)) et par une meilleure compréhension des mécanismes responsable de l'hypertension portale. Ces progrès déjà obtenus dans la prise en charge de la cirrhose ont rendu inutile la transplantation hépatique pour les stades intermédiaires de cirrhose [307]. Mais il reste encore beaucoup à faire, particulièrement pour l'optimisation de la prise en charge des formes les plus sévères, où la mortalité reste encore importante.

## **1.2) Buts et cheminements du travail sur l'ascite et le cortisol**

### **L'ascite**

Mes premiers travaux ont concerné l'ascite du patient cirrhotique car il s'agit d'une complication fréquente, spectaculaire, et dont la prise en charge repose encore souvent sur un traitement en apparence lourd et archaïque : les ponctions d'ascite itératives en milieu hospitalier. En effet, la moitié des malades atteints de cirrhose compensée développe une ascite dans les 10 premières années d'évolution. Elle marque un tournant évolutif décisif dans l'histoire naturelle de la cirrhose. Le taux de survie à 1 an et à 5 ans après l'apparition de l'ascite se réduit à 50 % et à 30 %, respectivement et ne dépasse pas 20 % à 1 an

lorsque l'ascite est « réfractaire » [131], c'est-à-dire non contrôlable par un traitement médicamenteux. Plus récemment une équipe danoise a revu l'histoire naturelle de la cirrhose alcoolique (principale cause de cirrhose en France) à partir d'une cohorte de 466 patients. Les données de cette étude témoignent de l'importance de l'ascite pour la découverte de la cirrhose et de la mortalité non négligeable de ces patients malgré les progrès thérapeutiques récents. Au moment du diagnostic de cirrhose, 24% des patients n'avaient pas de complications, 55% avaient une ascite, 6% avaient une hémorragie suite à une rupture de varices, et 11% avaient une encéphalopathie. La mortalité à 1 an était, selon ces catégories initiales de patients, respectivement de 17%, 29%, 20%, et 64% [152]. Globalement, 49% des patients ayant une cirrhose compensée initialement développaient une complication dans les 5 ans. Lorsqu'on s'intéresse au groupe de patients ayant initialement ou secondairement une ascite (n=287), la survie médiane était de 37 mois. Après 1 an de suivi, 59% étaient en vie sans autre complication, 12% étaient en vie mais avec une autre complication, 15% étaient décédés sans autre complication et 14% étaient décédés après avoir développé une autre complication. Après 5 ans de suivi, ces pourcentages étaient respectivement de 32%, 9%, 25% et 33%.

Le diagnostic de l'ascite est généralement aisé lorsque celle-ci est abondante (> 1,5 litres) et peut-être facilité par l'échographie pour les ascites de plus faibles volumes. La paracentèse est un geste en principe sûr, ne nécessitant pas de précautions particulières vis à vis des troubles de l'hémostase inhérents au patient cirrhotique [246]. Cependant, peu d'études s'étaient attachées à observer prospectivement les complications potentielles des paracentèses. En collaboration avec l'équipe d'Antoine Hadengue (Genève, Suisse), nous avons suivi une large cohorte de patients cirrhotiques ayant eu une paracentèse et colligé tous les événements indésirables suivant ce geste considéré comme banal (**cf. article 1 de cette thèse, [97]**).

Notre second travail, non présenté in extenso dans la présente thèse, concerne le dosage des électrolytes dans l'ascite. Les patients cirrhotiques avec ascite ont parfois un capital veineux appauvri par les multiples prélèvements qu'ils subissent et parfois, le simple recueil d'un ionogramme sanguin relève de l'exploit. Nous avons donc eu la curiosité de mesurer les électrolytes dans l'ascite pour prédire les valeurs sanguines [213]. Ce travail, non présenté dans cette thèse, retrouvait des corrélations hautement significatives entre les concentrations de sodium, de potassium, d'urée et de créatinine dans le sang et l'ascite par les automates usuels en particulier pour les valeurs nécessitant des modifications des doses de diurétiques ( $\text{Na} < 125 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{K} \geq 5,5 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{K} < 3,2 \text{ mmol/L}$ , Créatinine  $\geq 133 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ). L'analyse de ces électrolytes dans l'ascite permettait de prédire les valeurs sanguines avec des sensibilités respectives de 100%, 89%, 71% et 92%, et des spécificités de 100%, 95%,

98%, et 92%. Cette étude est la seule à avoir validé l'usage des électrolytes dosés directement dans l'ascite sur une large population de patients cirrhotiques.

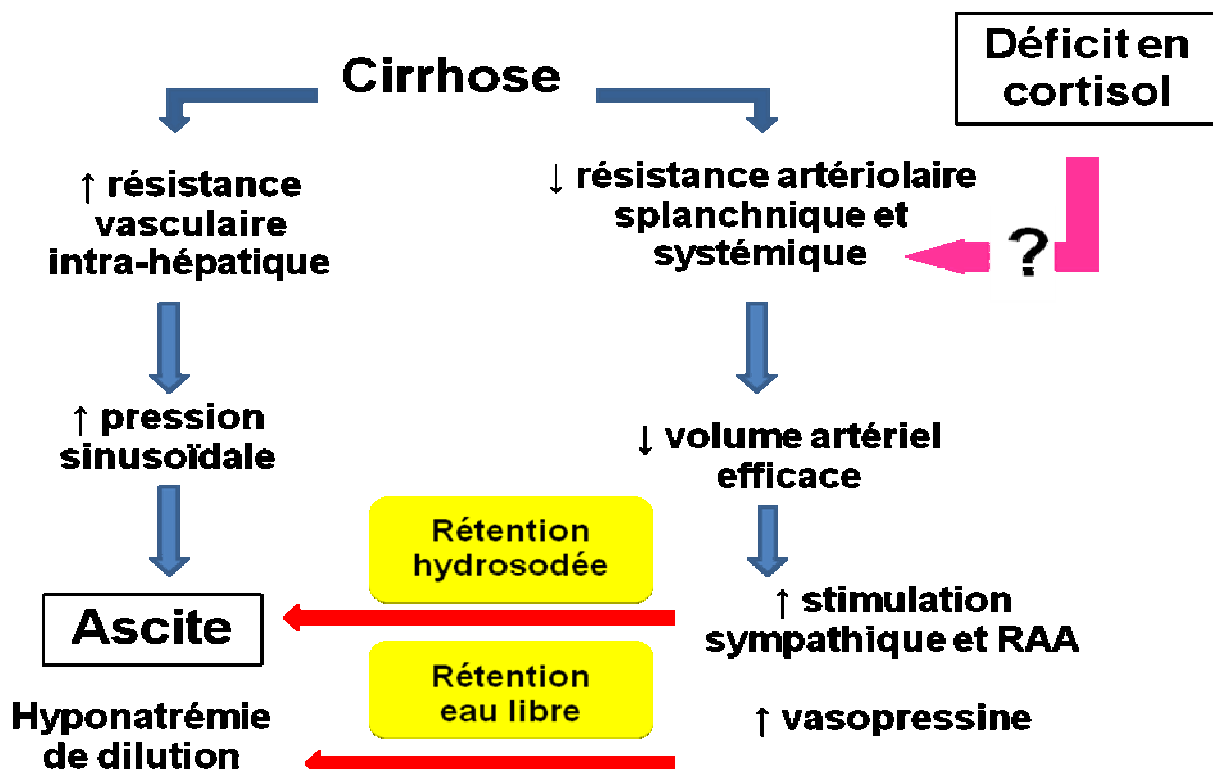
Les infections bactériennes du patient cirrhotique sont fréquentes et souvent sévères [139]. Environ 30 à 40% des cirrhotiques présentent une infection dès l'admission à l'hôpital ou en développent une en cours d'hospitalisation. De plus, 15 à 35% des cirrhotiques hospitalisés développent une infection nosocomiale [68], définie par un début après la 48<sup>ème</sup> heure d'hospitalisation. Ce chiffre peut être comparé au taux de 5% à 7% d'infections nosocomiales observé dans la population générale [210], et souligne la vulnérabilité des patients cirrhotiques. La prévalence de l'infection spontanée du liquide d'ascite varie de 10% à 30%. Il s'agit de la principale complication infectieuse du patient cirrhotique [237]. La moitié de ces ISLA sont déjà présentes à l'admission du patient et plus de 20% de ces infections, aussi nommées « péritonites spontanées », sont totalement asymptomatiques. Le retard au traitement de l'infection d'ascite est préjudiciable et l'ISLA méconnue engendre une lourde mortalité. Même lorsque l'antibiothérapie est débutée immédiatement après le diagnostic d'ISLA, la mortalité intra-hospitalière reste élevée, classiquement décrite entre 30% et 50% [177, 250, 296, 297]. Dans les études les plus récentes, le taux de mortalité demeure élevé (de l'ordre de 20%) et principalement lié au développement d'un sepsis sévère, d'un choc septique et d'un syndrome hépato-rénal [126, 282] ; le pronostic à moyen terme reste également sévère ; en effet, la probabilité de survie après un épisode d'ISLA est de 30-50% à 1 an et chute à 25-30% à 2 ans. C'est pourquoi, les patients survivant à un premier épisode d'ISLA sont candidats à la transplantation hépatique [2, 305]. Compte tenu des conséquences pronostiques majeures et du caractère asymptomatique de ces infections, l'examen du liquide d'ascite avec numération des polynucléaires neutrophiles et cultures bactériologiques reste recommandé lors de toute ponction, ce qui alourdit la prise en charge. C'est la raison pour laquelle, les cliniciens sont sensibles aux procédés susceptibles de simplifier le diagnostic de l'ISLA ou de le rendre plus rapide. L'utilisation des bandelettes urinaires (BU) utilisées pour le diagnostic des infections urinaires méritait d'être testée dans cette indication. Le second article présenté dans cette thèse est une étude prospective sur l'utilisation des BU pour le diagnostic rapide de l'ISLA (cf. **article 2 de cette thèse, [290]**). Nous avons trouvé que les performances diagnostiques des BU étaient intéressantes dans la pratique clinique. Toutefois, les résultats encourageants affichés par cette étude monocentrique publiée en 2004 n'ont pas été reproduits par une seconde étude de plus grande envergure (étude nationale multicentrique coordonnée par le Pr Nousbaum (cf. **article 3 de cette thèse, [217]**). L'engouement des cliniciens pour l'utilisation des BU dans cette indication, et les résultats contradictoires de la littérature ont justifié que nous réalisions en 2008 une revue critique de la littérature sur ce sujet [212].

### **Le cortisol**

Empêcher ou ralentir l'évolution d'une cirrhose compensée vers le stade de décompensation est l'objectif recherché par tous les cliniciens afin de préserver la qualité de vie et le pronostic de ces malades. Certains facteurs de décompensation sont systématiquement recherchés et font l'objet d'un traitement spécifique, dont le succès engendre un bénéfice pronostique **[184, 191, 227, 312]** : traitement des hépatites virales B et C, arrêt de l'intoxication alcoolique et corticothérapie pour les hépatites alcooliques aiguës sévères, mise en place d'un traitement spécifique des maladies auto-immunes hépatiques (corticoïdes, acide ursodésoxycholique,...), saignées pour l'hémochromatose, etc. D'autres facteurs peuvent aggraver l'hypertension portale (notamment les médicaments hypotenseurs) et entraîner l'apparition de l'ascite ; les bêta-bloquants sont considérés actuellement comme « l'aspirine » de l'hépatologue car ils réduisent l'hypertension portale en diminuant le débit cardiaque (blocage des récepteurs  $\beta_1$  cardiaques) et en provoquant une vasoconstriction splanchnique (blocage des récepteurs  $\beta_2$  splanchniques). Cependant, l'équipe de Beaujon a récemment attiré notre attention sur l'effet délétère potentiel des bêta-bloquants chez les patients cirrhotiques ayant une ascite réfractaire **[263]**. Dans cette étude, l'effet délétère des bêta-bloquants était attribué à la chute tensionnelle plus marquée dans le groupe propranolol (123 vs 103 mmHg ;  $p < 0,0001$ ) avec une mise en jeu, supposée plus intense dans le groupe propranolol, des systèmes de compensation volémique (système rénine angiotensine, vasopressine et système sympathique). Ces résultats alarmants ont récemment fait l'objet de plusieurs controverses auxquelles nous avons participé **[12, 15, 165, 291, 292]** et invitent à promouvoir un essai randomisé sur cette question brûlante. Un sepsis, lié ou non à une ISLA, peut aussi aggraver l'hypertension portale et le pronostic par le biais d'une hypovolémie efficace. L'administration d'albumine humaine est souvent utilisée pour améliorer le pronostic des malades ; cette prescription d'albumine est admise depuis plusieurs années au cas d'ISLA **[274]** mais requiert une confirmation pour les autres sepsis dans la cirrhose sévère. Un essai national multicentrique coordonné par mes soins et financé par deux PHRC (2008 et 2011) est actuellement en cours pour tenter de répondre à cette question. Même en dehors d'un sepsis avéré, l'inflammation systémique prolongée et probablement perpétuée par des phénomènes de translation bactérienne est un facteur de mortalité à court terme chez le patient cirrhotique sévère (Child-Pugh  $> 7$ ) ; nous avons pu montrer que la CRP était une variable pronostique indépendante des scores pronostiques connus (MELD et Child-Pugh) pour prédire le décès à 6 mois (**cf. article 4 de cette thèse**). Il est intéressant de noter que les concentrations de CRP étaient significativement plus faibles chez les patients recevant des bêta-bloquants

suggérant que ces médicaments pourraient améliorer la survie en diminuant l'inflammatoire systémique.

Le déficit absolu ou relatif en cortisol pourrait aggraver l'hypertension portale, comme indiquer sur le schéma de la **figure I** ci-dessous. Le cortisol a en effet une action permissive pour la vasoconstriction induite par les catécholamines [332] et inhibe la production de NO (inhibition de la iNOS) ; son déficit pourrait donc aggraver la vasodilatation systémique et splanchnique.



**Figure I** : Physiopathologie du développement de l'ascite et implication potentielle du déficit en cortisol dans l'aggravation de l'hypertension portale. Le déficit en cortisol favoriserait la vasodilatation splanchnique, conduisant à une hypovolémie efficace.

Cependant, la fonction surrénalienne a été peu étudiée chez le patient cirrhotique « stable » ou au cours du stress (comme le sepsis). Malgré une littérature grandissante, il est difficile d'identifier et de comprendre l'impact de la dysfonction surrénalienne sur l'histoire naturelle et le pronostic de la cirrhose, et le concept d'insuffisance surrénale associée à la cirrhose ou « syndrome hépato-surrénalien », est très critiquable. Cela provient sans doute de difficultés dans l'interprétation des tests évaluant la fonction surrénale chez le patient cirrhotique (cf. **article 5 de cette thèse** [289]). Nous avons réalisé une étude pilote explorant la fonction surrénale chez le patient cirrhotique infecté et non infecté, et selon les

différents stades de la cirrhose évalués par le score de Child-Pugh (étude financée par un PHRC interrégional en 2008). Les résultats que nous détaillerons ultérieurement permettent de mieux comprendre pourquoi les publications antérieures revendiquaient une forte prévalence de l'insuffisance surrénale tant chez le patient hémodynamiquement stable que chez le malade septique (cf. **article 6 de cette thèse, [288]**). Avec l'aide de deux équipes américaines expertes dans le domaine de la fonction surrénale, j'ai pu compléter mes travaux en analysant les résultats du test au Synacthène à 1 µg sur chez les patients de la cohorte CORTICIR (cf. **article 7 de cette thèse**).

Les résultats que nous présentons dans cette thèse remettent en question l'existence du « syndrome hépato-surrénalien » puisque nous montrons ici que la prévalence élevée de l'insuffisance surrénale chez le patient cirrhotique avec les tests usuels (Synacthène à 1 µg ou à 250 µg) a été largement surestimé dans la littérature. Nul doute que ces données vont faire réagir la communauté scientifique. Avec l'équipe de Richard Dorin et Cliff Qualls (Albuquerque, USA), nous avons pu valider dans notre population de patients cirrhotiques une équation cubique permettant d'estimer la concentration sérique du cortisol libre, actuellement non réalisable en routine. Le cortisol libre sérique est pourtant l'hormone biologiquement active, la seule rendant compte précisément de la fonction surrénale. Nous avons également montré que l'estimation des concentrations du cortisol libre sérique par la formule de Coolens, équation quadratique souvent utilisée dans les publications pour estimer la concentration sérique du cortisol libre, ne sont pas valides chez le patient cirrhotique (communication présentée aux *Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive* 2011).



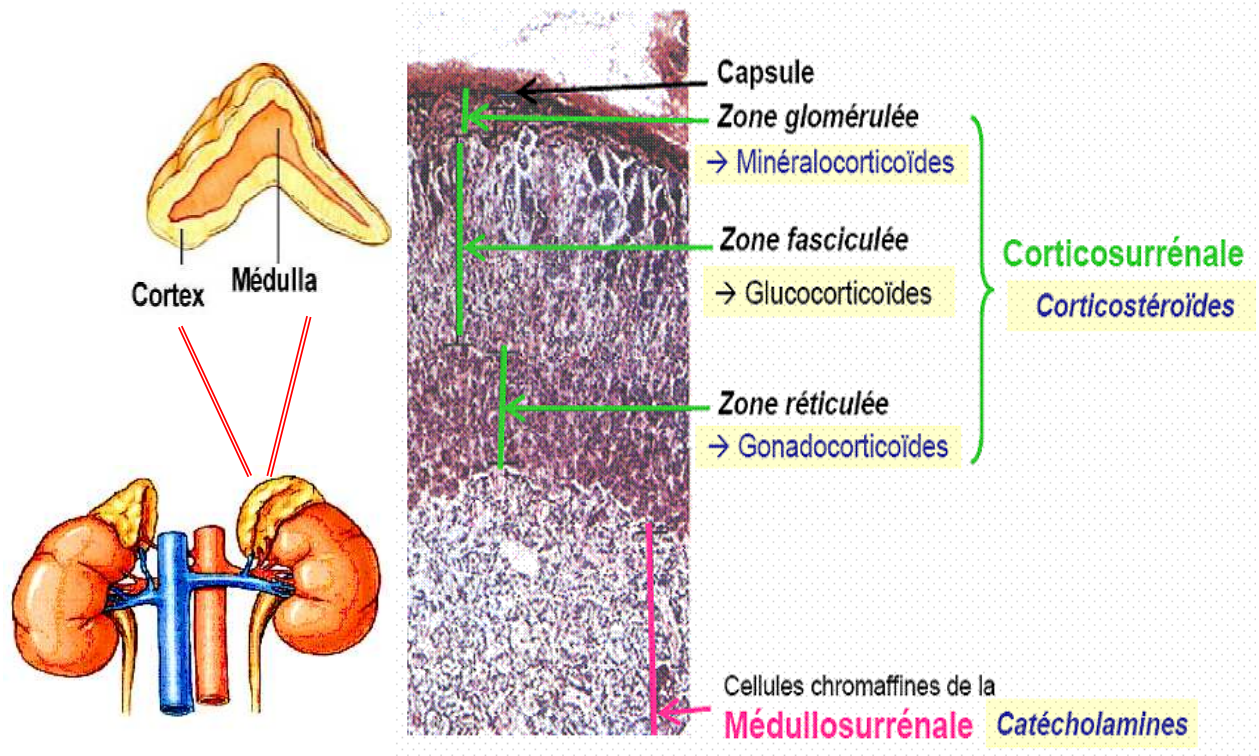
# Chapitre 2 : ETAT DES CONNAISSANCES

## 2.1) La surrénale

### 2.1.1) Anatomie

La glande surrénale est composée de deux structures fonctionnelles (**Figure II**) : la médullosurrénale qui synthétise les catécholamines (adrénaline, noradrénaline) et la corticosurrénale composée de trois zones : la zone glomérulée, localisée en périphérie, produisant les minéralocorticoïdes (aldostérone et corticostérone), la zone réticulée située plus au centre et produisant les androgènes (DHA, déhydroépiandrosterone), et la zone fasciculée produisant les glucocorticoïdes (cortisol et corticostérone). C'est la corticosurrénale qui est touchée dans l'insuffisance surrénale.

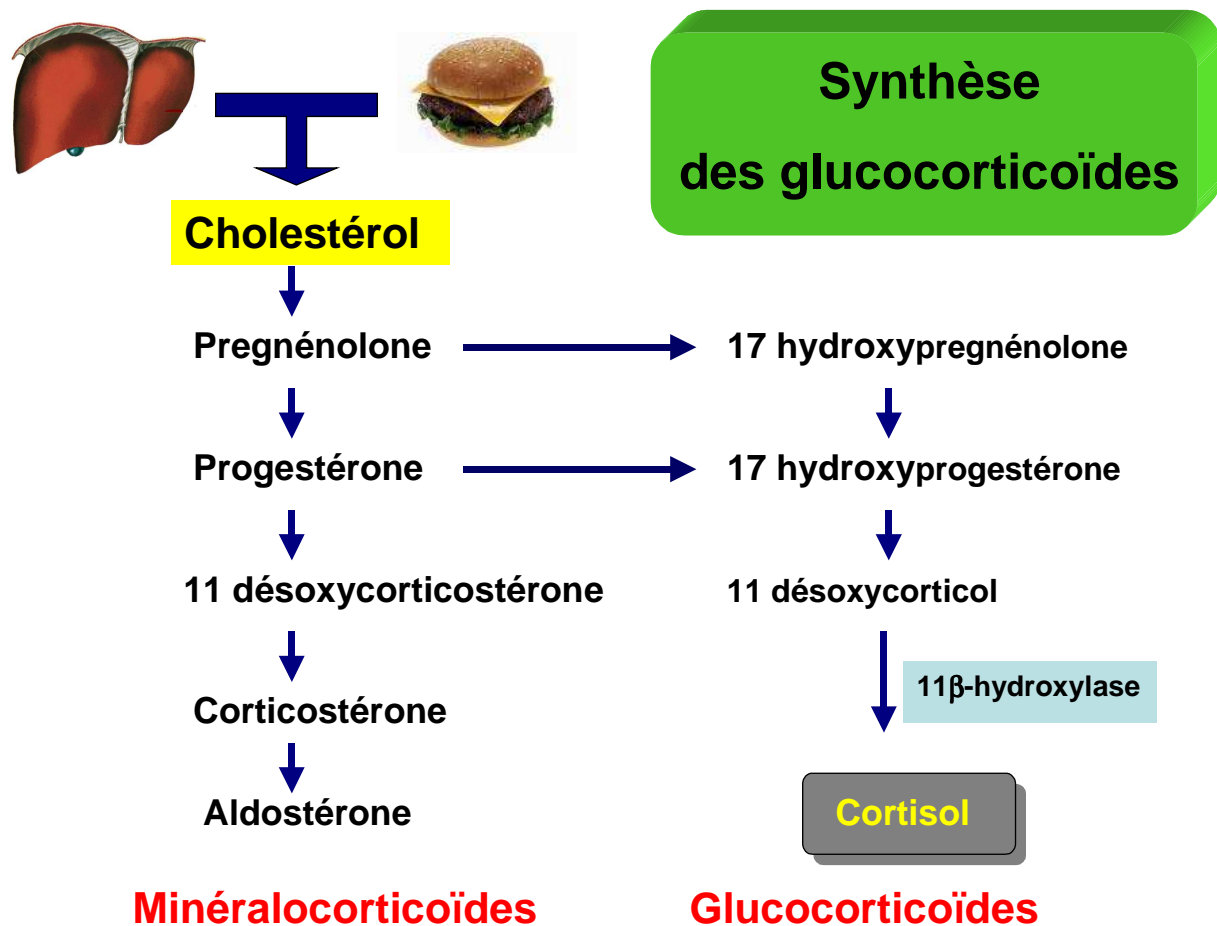
# Corticosurrénale



**Figure II** : Anatomie de la surrénale avec ses différentes zones fonctionnelles.

## 2.1.2) Régulation de l'axe corticotrope

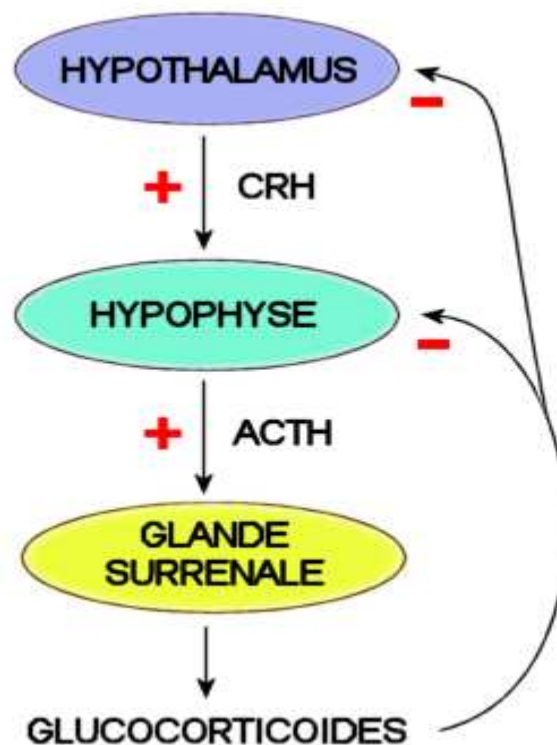
Le cortisol, principal glucocorticoïde, est une hormone stéroïde composée de 19 atomes de carbone et synthétisée à partir du cholestérol par une enzyme du cytochrome P450. La majeure partie de la production journalière de cholestérol vient du foie (**Figure III**). Mais la synthèse peut également se faire dans les intestins, les organes reproducteurs, et les glandes surrénales. Le cholestérol utilisé provient essentiellement du cholestérol circulant présent dans les lipoprotéines de basse densité (LDL) mais le cortisol peut être synthétisé localement à partir de l'acétyl CoA. La première étape de synthèse est la transformation du cholestérol en pregnénolone par l'intermédiaire d'une enzyme (la 20,22 desmolase).



**Figure III :** Les différentes étapes de la synthèse du cortisol

Le cortisol circule dans le plasma soit sous sa forme libre active (qui représente seulement 5–10 % du cortisol total), soit sous sa forme inactive, liée aux protéines de façon réversible. Les deux principales protéines de liaison sont la cortisol binding protein (CBG) et l'albumine [105]. En conséquence, la cortisolémie totale ne constitue pas un reflet fidèle de la fonction surrénalienne si les concentrations des protéines porteuses sont modifiées car elle varie alors dans le même sens. La concentration de la fraction libre de l'hormone, considérée comme biologiquement active, reste peu modifiée par la baisse ou l'élévation de ces deux protéines. Ainsi dans ces circonstances, et à défaut de doser directement la cortisolémie libre, il est possible de recourir au dosage de formes filtrées par l'organisme qui reflètent cette dernière (cortisolurie urinaire des 24 heures ou cortisol salivaire). Ces déterminations du cortisol filtré ne sont pas aisément applicables dans un contexte de soins intensifs (fonction rénale altérée, recueil salivaire difficile chez des patients sous assistance respiratoire...).

**L'axe corticotrope** : La synthèse des glucocorticoïdes est régulée par l'axe corticotrope (**cf. figure IV**).



**Figure IV :** L'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien

L'ACTH : La production du cortisol et sa sécrétion sont principalement induites par l'adrenocorticotrophie hormone (ACTH). Il s'agit d'une protéine de 39 acides aminés produite par l'hypophyse antérieure. Elle est obtenue après clivage d'un long précurseur, la pro-opiomélanocortine, qui libère également d'autres protéines (bêtaendorphine, lipotropine, mélanocyte-stimulating hormone). À court terme, l'ACTH stimule la synthèse et la sécrétion de cortisol même si le stock de cortisol dans la glande surrénale est bas ; à long terme, l'ACTH stimule également la synthèse d'enzymes impliquées dans la production du cortisol, de même que leurs cofacteurs et les récepteurs surrénaliens au LDL-cholestérol. L'ACTH stimule également la production des androgènes surrénaliens et, dans une moindre mesure, la production de minéralocorticoïdes [161]. La demi-vie de l'ACTH est courte, et la concentration de cortisol dans les veines surrénales augmente quelques minutes seulement après la sécrétion d'ACTH [82]. La sécrétion d'ACTH est régulée par plusieurs facteurs, parmi lesquels la corticotropin-releasing hormone (CRH) et l'arginine vasopressine (AVP), qui sont toutes les deux sécrétées par l'hypothalamus. L'AVP ne stimule que faiblement la sécrétion d'ACTH mais augmente fortement l'action de la CRH. La stimulation de la

sécrétion de l'ACTH par les catécholamines, l'angiotensine II, la sérotonine et le peptide intestinal vasoactif (VIP) est également connue. Enfin, certaines cytokines inflammatoires influencent la sécrétion d'ACTH, soit en la stimulant [interleukine (IL)-1, IL-2, IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ )] ou en l'inhibant (transforming growth factor bêta) [82, 299].

La CRH est une protéine de 41 acides aminés sécrétée par l'hypothalamus. Libérée dans l'axe hypothalamo-hypophysaire, elle stimule la synthèse et la sécrétion de pro-opiomélanocortine. Les agonistes adrénergiques (noradrénaline) et la sérotonine stimulent sa production, alors que la substance P, les opiacés et l'acide gamma-aminobutyrique l'inhibent. Les cytokines inflammatoires (IL-1, IL-2, IL-6, TNF-alpha) influencent également la production de CRH et maintiennent ainsi une forte production de cortisol [54, 82, 189, 190, 226, 299, 301]. Il existe des récepteurs de l'IL-6 au niveau des cellules corticotropes de l'hypophyse et de la corticosurrénale [226, 300]. L'action de ces cytokines est synergique avec la CRH. Enfin, les glucocorticoïdes exercent un rétrocontrôle négatif sur l'axe corticotrope, en inhibant la production d'ACTH, la transcription du gène codant pour la pro-opiomélanocortine et la production de CRH et d'AVP. La sécrétion des hormones de l'axe corticotrope (ACTH, CRH et AVP) est pulsatile au cours du cycle circadien. L'amplitude des pics sécrétoires varie au cours de la journée avec un maximum le matin entre 6 h 00 et 8 h 00, puis une décroissance rapide jusqu'à midi et une décroissance plus lente jusqu'à minuit.

### 2.1.3) Rôle physiologique du cortisol

L'importance de la fonction de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HHS) et de la sécrétion cortisolique dans la réponse au stress avait été noté il y a près d'un siècle déjà ; en effet, il était observé que l'hypertrophie des glandes surrénales, les ulcérations gastriques et la dystrophie thymo-lymphatique étaient une triade classique de la réponse au stress [261]. Le rôle essentiel du cortisol pour la survie était noté pour la première fois par Addison en 1855 ; les animaux ayant subi une surrénalectomie ne survivaient pas malgré des taux élevés de norépinéphrine [45, 280]. De nombreuses études ont documenté l'activation de l'axe HHS durant les périodes de stress en situation aiguë ou chronique, comme chez les patients ayant eu une chirurgie [207, 302], les sepsis [17, 21, 38, 59, 62, 158, 188, 222, 238, 244, 273], les traumatisés [38] ou les brûlés [308].

Le cortisol exerce de multiples fonctions [28] sur:

- Le catabolisme protéique, ce qui explique les conséquences musculaires (amyotrophie), osseuses (ostéoporose) et cutanées (fragilité, purpura) d'une sécrétion excessive ;

- le métabolisme glucidique (effet hyperglycémiant par néoglucogenèse hépatique et glycogénolyse) ;
- le métabolisme lipidique (lipolyse, répartition des graisses) ;
- l'excitabilité du système nerveux central et la stimulation de l'appétit ;
- la modulation du système immunitaire (immunosupresseur à forte dose).

D'autres actions lui sont rapportées : la diminution de l'absorption intestinale et l'augmentation de l'excrétion urinaire du calcium, le maintien de l'intégrité endothéliale, et le maintien d'un tonus vasculaire adéquat.

Ce dernier effet du cortisol est lié à une augmentation de la sensibilité aux vasopresseurs, comme les catécholamines et l'angiotensine II [89, 252]. Cet effet est médié par une augmentation de la transcription et de l'expression des récepteurs de ces hormones.

## 2.1.4) Etiologie des insuffisances surrénales

En 1855, Thomas Addison décrivait le premier les symptômes et signes cliniques principaux résultant de l'insuffisance corticosurrénalienne primaire, aujourd'hui communément appelée maladie d'Addison. Au cours de ces dernières décades, d'énormes progrès ont été réalisés, permettant aujourd'hui une meilleure compréhension des diverses causes de la maladie d'Addison chez l'enfant et l'adulte, ainsi que l'utilisation d'outils diagnostiques performants et un traitement efficace. Alors qu'il y a moins de trente ans, la destruction bilatérale des glandes surrénales par la tuberculose constituait la première cause de l'affection, aujourd'hui, dans nos pays industrialisés, l'infection par le bacille de Koch n'est responsable que de moins de 5 % des cas. L'étiologie auto-immunitaire prédomine largement, et d'autres affections responsables ont été découvertes comme le SIDA ou l'adrénoleucodystrophie liée à l'X... La *prévalence* de la maladie d'Addison dans nos pays est de l'ordre de soixante cas reconnus par million d'habitants, mais cette fréquence est probablement sous-estimée. La maladie n'est en effet reconnue que tardivement car ses symptômes sont aspécifiques et n'apparaissent que de manière graduelle et insidieuse. Dans certains cas, une décompensation brutale («la crise addisonienne») survient à l'occasion d'une infection ou d'un traumatisme, et entraîne le décès du patient avant même que le diagnostic n'ait été posé.

A l'opposé de la maladie d'Addison, l'insuffisance surrénale secondaire résulte d'un processus réduisant la synthèse d'ACTH par l'hypophyse en raison d'une pathologie hypophysaire ou hypothalamique. Le plus souvent, les cas de nécrose ou d'hémorragie de l'hypothalamus ou de l'hypophyse dans le cadre d'un sepsis sont la conséquence d'une

hypotension prolongée ou de troubles sévères de la coagulation [264]. Le sepsis peut également décompenser une insuffisance surrénale secondaire chronique connue ou latente, qui peut être due à une tumeur hypothalamique ou hypophysaire, à une inflammation chronique ou à un déficit congénital en ACTH. Une des principales causes d'insuffisance surrénale secondaire est la corticothérapie, qui inhibe la sécrétion de CRH et d'ACTH lorsqu'elle est prescrite à plus de 10 mg par jour.

Les principales causes de la maladie d'Addison et des insuffisances surrénales secondaires ne seront pas détaillées.

Les causes de loin les plus fréquentes de maladie d'Addison (et les seules à envisager lorsque l'affection survient après l'enfance) sont les affections qui vont conduire à une destruction ou une disparition quasi complète des deux cortex surrénaliens. Il doit en effet rester moins de 10 % de tissu surrénalien fonctionnel pour qu'une insuffisance clinique apparaisse.

La **maladie d'Addison** est la cause la plus fréquente, liée à une destruction auto-immunitaire du cortex surrénalien. Comme dans le diabète de type 1 auto-immun et dans la thyroïdite chronique auto-immunitaire d'Hashimoto, interviennent à la fois des mécanismes immunitaires *cellulaires* (infiltration du cortex par les lymphocytes B et T, types CD4+ et CD8+; déficit généralisé en lymphocytes T-suppresseurs,...) et *humoraux* (production d'anticorps spécifiques contre des antigènes surrénaliens, notamment des enzymes impliquées dans la biosynthèse des stéroïdes). L'insuffisance surrénalienne auto-immune peut exister isolément dans la moitié des cas ou être associée à une ou plusieurs autres endocrinopathies auto-immunes (hyper/hypothyroïdie, Insuffisance ovarienne ou testiculaire, diabète de type 1, hypoparathyroïdie, anémie perniciose). La combinaison d'une maladie d'Addison avec une ou plusieurs autres endocrinopathies auto-immunes constitue un *syndrome polyglandulaire auto-immun*.

La **tuberculose** peut détruire les glandes surrénales par extension hématogène, le plus souvent à partir d'un site primitif pulmonaire. Au stade actif, les glandes sont habituellement hypertrophiées par l'infiltrat inflammatoire et les granulomes. Ultérieurement, la fibrose s'installe ainsi que des calcifications, bien visibles au scanner chez 50% des patients. Le traitement anti-tuberculeux permet généralement la guérison de l'infection, mais pas la récupération de la fonction surrénalienne. Bien plus, le traitement par rifampicine (un inducteur enzymatique hépatique) peut décompenser une insuffisance surrénalienne latente en augmentant le métabolisme du cortisol.

Certaines **infections mycotiques** généralisées (histoplasmosse, coccidioido-mycose) sont d'importantes causes d'insuffisance surrénalienne en régions endémiques, mais sont exceptionnelles en France.

**Le SIDA** peut s'accompagner de déficience cortico-surrénalienne, le plus souvent partielle, par divers mécanismes: infection nécrotique par cytomégalovirus, infection par mycobactéries atypiques, par cryptococoques ou infiltration métastatique par un sarcome de Kaposi. Ainsi, 8 à 14% des patients sidéens ont une réponse en cortisol diminuée à l'injection d'ACTH et pourraient bénéficier d'un traitement supplétif par glucocorticoïdes.

**Une hémorragie avec nécrose bilatérale des surrénales** peut survenir lors de *septicémie* (à méningocoques – syndrome de Waterhouse-Fridericksen – ou à *pseudomonas aeruginosa* chez l'enfant), lors de *syndrome hémorragique* (CIVD, syndrome antiphospholipides) ou lors de *traitement anticoagulant* excessif. Un stress sévère, un traumatisme, une intervention chirurgicale, une thrombocytopénie sont autant de facteurs favorisant. L'hémorragie bilatérale avec infarctus surrénalien donne habituellement une insuffisance cortico-surrénalienne sévère et rapide, conduisant à la « crise addisonienne » qui constitue une véritable urgence.

**Les infiltrations métastatiques** : les glandes surrénales sont un site particulièrement fréquent de métastases hématogènes du cancer bronchique et du cancer du sein (40 à 60%), du mélanome malin (30%) et du cancer de l'estomac ou du colon (15-20%). C'est aussi un site d'extension des lymphomes. L'insuffisance cortico-surrénalienne est cependant plus rare et habituellement partielle.

**Certains médicaments** inhibent la synthèse des stéroïdes à fortes doses (ketoconazole,, aminogluthétimide, étomidate,...) ou sont cytotoxiques pour les cellules cortico-surrénaliennes (mitotane). Par ailleurs, certains médicaments accélèrent le métabolisme du cortisol : la rifampicine, la cyclosporine, la clarithromycine,... [5, 16]

**La cirrhose** ne fait pas partie classiquement des causes d'insuffisances surrénales mais une littérature récente la décrit comme une cause potentielle, que ce soit chez le patient cirrhotique en état hémodynamique stable et surtout chez le patient cirrhotique instable (sepsis sévère ou choc septique). Nous verrons dans le *chapitre 2.2.2.1* les hypothèses physiopathologiques faisant évoquer une association non fortuite entre la cirrhose hépatique et l'insuffisance surrénale.

## **2.1.5) Symptômes et signes cliniques**

Les symptômes et signes cliniques résultent de l'insuffisance progressive en glucocorticoïdes, en minéralocorticoïdes et en androgènes (cette dernière étant surtout



marquée chez la femme). Le début est insidieux, les symptômes sont pour la plupart aspécifiques et le diagnostic est parfois difficile au début de l'affection. Presque tous les patients se plaignent de *fatigue* chronique, de lassitude, de « mal-être » généralisé. L'appétit est diminué et des *symptômes gastro-intestinaux* sont fréquents (nausées matinales, douleurs, diarrhées alternant avec constipation, ...). Des *malaises* atypiques surviennent fréquemment, sont en rapport avec une hypotension artérielle posturale, soit par faiblesse musculaire, troubles neuropsychiques ou hypoglycémie. Les *troubles neuro-psychiques* sont parfois sévères (dépression, confusion mentale, hallucinations, agitation, altération des fonctions cognitives, ...) au point que le patient est traité pour une maladie psychiatrique. Parmi les autres plaintes fréquentes, citons encore les myalgies et arthralgies diffuses, les troubles sexuels, et la recherche d'aliments salés (« salt craving ») qui doit attirer l'attention du clinicien vers un déficit en minéralocorticoïdes avec perte de sel.

**L'examen clinique permet d'objectiver :**

- un *amaigrissement* inexpliqué (par anorexie et déshydratation),
- une *hyperpigmentation* (assez caractéristique de la maladie d'Addison, liée à l'augmentation des taux en ACTH et en MSH, qui stimulent l'activité des mélanocytes et l'accumulation de mélanine dans les cellules basales de l'épiderme); cette hyperpigmentation est surtout marquée au niveau des régions exposés à la lumière, aux endroits de friction et de pression, dans le creux des mains, sur les aréoles mammaires, au niveau des gencives ou des cicatrices récentes,
- une *hypotension artérielle*, surtout posturale, avec fréquence cardiaque accélérée,
- une perte de la pilosité axillaire et pubienne chez la femme, par déficit en androgènes.

Les patients sont plus sensibles à l'effet des sédatifs et des analgésiques, et récupèrent plus lentement d'une infection ou d'une intervention chirurgicale. En l'absence de diagnostic précoce, une crise addisonienne va survenir tôt ou tard, précipitée par un stress intercurrent ou des troubles digestifs sévères. Elle se manifeste par un choc hypovolémique avec hypotension et déshydratation, par des douleurs abdominales intenses accompagnées de vomissements et pouvant simuler un abdomen aigu par une fièvre inexpiquée et une altération progressive de l'état de conscience jusqu'au coma. L'administration intraveineuse de glucocorticoïdes et la réhydratation s'imposent alors de manière urgente.

Le diagnostic d'insuffisance surrénale dans le sepsis est difficile car la plupart des symptômes habituels perdent de leur spécificité (fièvre, altération de la conscience, hypotension réfractaire au remplissage et aux vasopresseurs). Il faudra donc y penser pour la diagnostiquer par des dosages hormonaux.

## 2.1.6) Signes biologiques

L'*hyponatrémie* est très fréquente (90%), liée à la fois au déficit en minéralocorticoïdes qui entraîne une natriurèse excessive et à l'insuffisance en cortisol qui conduit à une sécrétion inappropriée d'ADH (vasopressine) avec rétention d'eau libre. Elle peut être partiellement compensée par une ingestion massive d'aliments salés qui caractérise certains patients avec maladie d'Addison.

L'*hyperkaliémie*, un peu moins fréquente (65%), s'accompagne d'une légère acidose hyperchlorémique et est en rapport uniquement avec le déficit en minéralocorticoïdes.

Citons enfin les signes biologiques d'hémoconcentration (augmentation de l'urée plasmatique), l'anémie et l'éosinophilie.

*Remarque:* L'insuffisance cortico-surrénalienne secondaire se caractérise globalement par les mêmes symptômes et signes que l'insuffisance primaire, avec les modifications suivantes:

- il n'y a pas d'hyperpigmentation ; au contraire, le patient avec insuffisance hypophysaire est généralement très pâle (anémie, taux d'ACTH et MSH bas),
- il n'y a pas de déshydratation et moins d'hypotension artérielle,
- il y a moins de troubles gastro-intestinaux (corrélés aux troubles hydro-électrolytiques)
- les hypoglycémies sont par contre plus fréquentes,
- enfin, l'hyponatrémie est présente (par hypersécrétion d'AVP), sans hyperkaliémie associée, puisqu'il n'y a pas de déficit en minéralocorticoïdes.

## 2.1.7) Le diagnostic de l'insuffisance cortico-surrénale

En présence de symptômes et de signes cliniques évocateurs, il faut penser à une insuffisance surrénalienne qui impliquera un traitement approprié et le plus souvent «salvateur», chez des patients parfois considérés jusque là comme « fatigués chroniques », fibromyalgiques, dépressifs ou porteurs de troubles digestifs fonctionnels.

Le diagnostic de la maladie d'Addison repose sur la mise en évidence conjointement:

- d'un *taux matinal bas du cortisol plasmatique*, généralement inférieur à 10 µg/dL (ou 276 nmol/L); le diagnostic est certain si le taux est inférieur à 3 µg/dL (80 nmol/L), il est pratiquement exclu si le taux dépasse 15 µg/dl (415 nmol/L),

- d'une *réponse insuffisante du cortisol plasmatique à l'injection iv de 250 µg ACTH* (test au Synacthène®), facile à réaliser en consultation à n'importe quel moment de la journée; normalement, le taux de cortisol doit dépasser la valeur de 18 µg/dl (500 nmol/L), 30 ou 60 minutes après l'injection d'ACTH. Une réponse normale exclut formellement une insuffisance corticosurrénalienne primaire et la majorité des insuffisances secondaires (à l'exception des insuffisances partielles et récentes),
- d'un *taux élevé en ACTH plasmatique*, généralement supérieur à 100 pg/mL et pouvant même dépasser 1000 pg/mL; ceci signe le caractère primaire de l'insuffisance surrénalienne,
- d'un *taux élevé de l'activité rénine plasmatique*, alors que l'aldostérone est abaissée ou proche de la limite inférieure des valeurs normales; ces éléments confirment le déficit en minéralocorticoïdes qui précède habituellement le déficit en glucocorticoïdes dans la maladie d'Addison autoimmune,
- de *taux abaissés en DHEA-sulfate*, en rapport avec l'insuffisance de production en androgènes surrénaliens. Celle-ci caractérise en effet la plupart des causes de maladie d'Addison, à l'exception notable de certains blocs enzymatiques surrénaliens (21-hydroxylase, 11-hydroxylase, 3 β- deshydrogénase) qui entraînent une production accrue de DHEA- sulfate.

Compte tenu des causes possibles de la maladie d'Addison et tenant compte de leur fréquence relative, les examens complémentaires les plus utiles à réaliser chez l'adolescent et l'adulte sont les suivants: 1) **une recherche des auto-anticorps surrénaux**, 2) **un dosage des acides gras à très longue chaîne** (augmentés dans l'adrénoleucodystrophie liée à l'X), 3) **un CT-Scanner des glandes surrénales** à la recherche d'une pathologie infectieuse, hémorragique ou tumorale, 4) la **recherche d'une tuberculose** (Radio de thorax, IDR, recherche de BK dans les urines, ...) et d'une **infection HIV**, en l'absence d'autre cause évidente. La **biopsie surrénalienne** guidée par échographie ou CT-Scan n'est indiquée qu'en cas de suspicion de lymphome ou de métastases secondaires.

## **2.1.8) Les dosages hormonaux et tests de stimulation**

### **2.1.8.1) Hypoglycémie induite par l'insuline**

Ce test de tolérance à l'insuline mesure la réponse du cortisol à une hypoglycémie provoquée par l'administration intraveineuse d'insuline. Ce test est souvent considéré comme le test de référence car il évalue la capacité de l'ensemble de l'axe corticotrope à répondre à la situation de stress représentée par une hypoglycémie. Après administration d'insuline (0,1 UI/kg), la glycémie est prélevée au moment où l'hypoglycémie est symptomatique (la glycémie doit descendre en dessous de 40 mg/dL [ $< 2,2$  mmol/L]). Chez les patients obèses avec insulino-résistance, la dose usuelle d'insuline doit être augmentée à 0,15 U/kg [93]. Un pic sérique de cortisol supérieur à 18 µg/dL est considéré comme normal.

Le test de tolérance à l'insuline présente certaines limites en termes de reproductibilité et de clarté des seuils de validité [219, 229]. De plus, il est contre-indiqué en cas d'instabilité hémodynamique (notamment en cas de choc septique). Enfin, l'insulino-résistance périphérique caractérisant le choc septique rend ce test moins précis dans ce contexte.

### **2.1.8.2) Test à la métopirone**

Le test à la métopirone mesure la capacité de l'axe corticotrope à répondre à une baisse brutale du taux sérique de cortisol. La métopirone inhibe la 11-hydroxylase, l'enzyme impliquée dans la dernière étape de la synthèse du cortisol. Cette inhibition provoque une diminution brutale du cortisol, qui entraîne une élévation compensatrice du taux d'ACTH et du précurseur du cortisol, le 11-désoxycortisol. L'administration de métopirone (30 mg/kg ; dose maximale 3000 mg) a lieu à minuit, et les taux sanguins de cortisol, et de 11-désoxycortisol sont mesurés le lendemain matin à 8 h [42]. En réponse à la métopirone, le taux sérique de cortisol doit diminuer de 5 µg/dL et le taux de 11-désoxycortisol doit augmenter de 7 µg/dL. Ce test peut être réalisé chez les patients en bonne santé, ainsi que chez les patients d'unité de soins intensifs qui ont une nutrition entérale. Il doit être réalisé très prudemment en raison du risque d'insuffisance surrénale aiguë. Une étude récente a confirmé la valeur diagnostique du test au Synacthène en le comparant au test à la métopirone utilisé comme gold-standard. Le test à la métopirone restant utile dans certaines situations d'insuffisance surrénale secondaire où le test au Synacthène ne permet pas de conclure [20].

### **2.1.8.3) Test à la CRH**

Le test de stimulation à la CRH mesure la capacité de l'hypophyse à sécréter de l'ACTH sous l'action de la CRH. De la CRH ovine (1 µg/dL) est injectée par voie intraveineuse, et la cortisolémie est mesurée à 15, 30 et 60 minutes. Ce test a été proposé pour différencier les insuffisances surrénales secondaires (maladie hypophysaire) et tertiaire (maladie hypothalamique). Cependant, la pertinence de ce test reste controversée [258].

### **2.1.8.4) Test au Synacthène**

Il existe deux types de test au Synacthène : celui dosé à 250 µg le plus utilisé et celui à 1 µg qui pourrait améliorer la sensibilité du test pour le dépistage de l'insuffisance surrénale dans les atteintes hypothalamo-hypophysaires. Les seuils définissant l'insuffisance surrénale ne sont pas clairement tranchés et comportent des variations selon les publications. Cependant, les seuils rapportés après Synacthène sont identiques à 30 minutes pour le test à 1 µg et à 60 minutes pour le test à 250 µg (**Figure V**).

#### **Avant Synacthène :**

Le dosage statique du cortisol mesure les taux sériques d'ACTH et de cortisol le matin, au moment du dernier pic de sécrétion. Ce test requiert l'intégrité du rythme circadien du cortisol. Un taux sérique de cortisol inférieur à 3 µg/dL (80 nmol/L) signale l'existence d'une insuffisance surrénale [220]. Dans ce cas, le taux sérique d'ACTH va permettre de distinguer l'insuffisance surrénale primitive de l'insuffisance surrénale secondaire. Dans l'insuffisance surrénale primitive, le taux d'ACTH est presque invariablement supérieur à 100 pg/ mL, alors que dans l'insuffisance surrénale secondaire, le taux d'ACTH peut être bas ou « anormalement normal ».

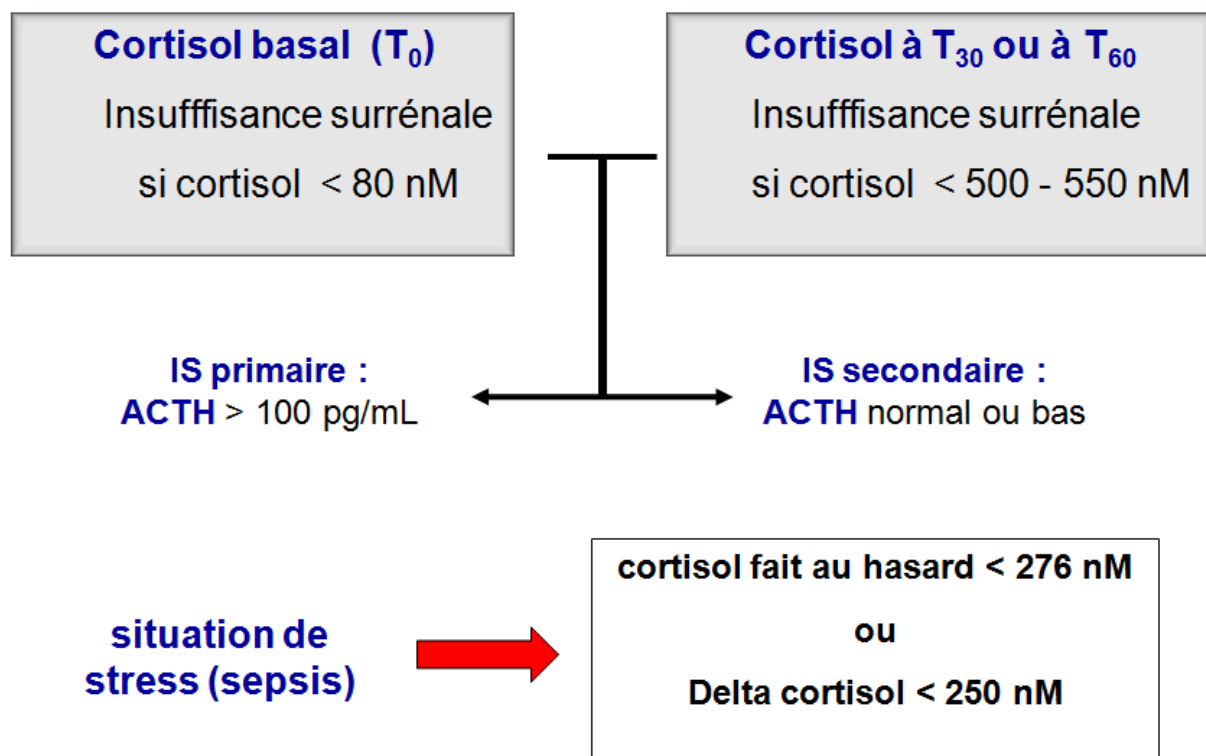
#### **Après Synacthène :**

Le test au Synacthène est le test le plus utilisé pour évaluer la fonction surrénale. Il repose sur l'incapacité de la glande surrénale déficiente à répondre par une sécrétion intense de cortisol à l'injection d'ACTH. L'ACTH est injectée par voie intraveineuse (ou intramusculaire), et le taux sérique de cortisol est mesuré à 30 et 60 minutes. Les tests standards pour le

dosage du cortisol sérique déterminent les concentrations d'hormone totale (i.e., les fractions libres et liés du cortisol).

Dans les états sévères, comme le sepsis, le taux sérique de cortisol devrait excéder 18 µg/dL (500 nmol/L) à tout moment. Les seules exceptions sont les patients ayant une hypoprotidémie profonde, comme chez les patients cirrhotiques où le taux de cortisol total n'est plus juste [43]. Par ailleurs, au cours du sepsis, des taux élevés de cortisol total peuvent aussi être la conséquence d'une diminution de son élimination ou d'une résistance tissulaire et par conséquent les tests dynamiques de la fonction surrénale sont essentiels pour exclure le diagnostic d'insuffisance surrénale.

Au cours du sepsis sévère, des cortisolémies mesurées au hasard et inférieures à 10 µg/dl (276 nmol/L) ou une augmentation du cortisol inférieure ou égale à 9 µg/dl (248 nmol/L) indiquent l'existence d'une insuffisance surrénale et identifient les patients devant bénéficier d'un traitement substitutif [21, 92, 187]. Enfin, une augmentation de la cortisolémie supérieure à 9 µg/dL avec un taux de base au-dessus de 44 µg/dL suggère une résistance tissulaire aux corticoïdes. [20].



**Figure V :** Diagnostic de l'insuffisance surrénale (IS) avec le test au Synacthène

Comme les taux d'ACTH sérique dans les suites d'un bolus de 250 µg d'ACTH (test au Synacthène fort) dépassent de plusieurs fois les taux atteints lors d'intervention chirurgicale majeure (taux retrouvés à 10000-60000 pg/mL), il a été suggéré que le test à forte dose pourrait ne pas diagnostiquer les insuffisances surrénales secondaires modérées [133]. Par conséquent, le test avec 1 µg d'ACTH (test au Synacthène faible) a été présenté comme plus sensible (taux retrouvés d'ACTH à 100-300 pg/mL) [101].

### **Particularités du test au Synacthène à 1 µg**

Chez les sujets sains, 1 µg d'ACTH est la dose la plus faible capable de produire une réponse surrénalienne maximale [206]. Cependant, 1 µg d'ACTH n'induit une stimulation supra-maximale des surrénales que pendant 30 minutes seulement et ne permet donc pas d'évaluer de façon appropriée la capacité de la glande surrénale à maintenir une production de cortisol maximal en réponse à un état de stress majeur et continu comme le sepsis. Ce test n'est donc actuellement pas utilisé en cas de sepsis. Pourtant, Marik et al. avaient retrouvé chez des patients septiques une sensibilité plus élevée du test à faible dose par rapport au test à 250 µg (62% vs 29%) pour la détection de l'insuffisance surrénale. Le diagnostic de référence reposait sur la réponse hémodynamique aux corticoïdes [188]. De plus, l'interprétation des résultats du test à 1 µg d'ACTH est fortement dépendante du choix de la limite inférieure de la normale.

### **La principale difficulté du test à 1 µg réside dans sa préparation et son administration :**

Pour préparer une solution de Synacthène® immédiat « faible dose » (1 µg), il suffit de diluer 1 ampoule (1 mL) de Synacthène® immédiat 250 µg/mL dans 250 mL de sérum physiologique puis prélever 1 mL en laissant le temps au Synacthène® de bien diffuser dans le sérum physiologique. Ce test à 1 µg nécessite plusieurs étapes dans sa préparation et son administration qui peuvent conduire à un résultat faussement positif (i.e. diagnostic à tort d'une insuffisance surrénale). En effet, les études réalisées chez des volontaires sains ont montré un pourcentage non négligeable (20%) de faux positifs en utilisant ce test à 1 µg, attribué en partie à la perte d'ACTH au cours de la dilution ou de l'administration intra-veineuse (IV) dans la tubulure [317]. L'importance de la perte d'ACTH par adhérence à la tubulure plastique souligne la nécessité d'utiliser la tubulure la plus courte possible ou de réaliser le test en injection IV directe. La réalisation de ce test nécessite donc un apprentissage et une standardisation des procédures. Pour l'étude menée à Besançon (**cf. article 6** détaillée au *chapitre 3.6*, [288]) nous avons formé une infirmière pour ce type de test et les injections d'ACTH avaient été faites en IV directe.

Compte tenu des difficultés dans l'exécution du test au Synacthène faiblement dosé d'une part, et du fait que dans le choc septique le bénéfice du traitement substitutif n'a été démontré que chez les patients non répondeurs au test « forte dose » d'autre part, le test au synacthène standard reste de très loin le plus utilisé. Les données sur le test à 1 µg utilisé chez les patients gravement malades sont rares et la plupart des données disponibles concernent le test à 250 µg [39, 102, 103, 164, 309]. Aucune recommandation ne peut être faite actuellement sur l'utilisation du test à 1 µg. De plus, le test à 1 µg n'a pas été validé chez les patients ayant de faibles concentrations sériques en protéines porteuses (albumine, CBG) du cortisol, comme observé dans la cirrhose.

#### **Autres problèmes posés avec les tests au Synacthène (quel que soit le dosage) pour la détermination des concentrations du cortisol total :**

Ces tests commercialisés pour déterminer les concentrations sériques du cortisol total présentent des performances différentes (sensibilité, spécificité, coefficient de variation) du fait même des caractéristiques immunologiques différentes de ces tests [86]. Les différences rapportées pourraient être liées à des anticorps hétérophiles dans le plasma interférant avec les réactifs des tests [49, 260].

La reproductibilité des tests au Synacthène chez les patients gravement malades n'est pas bonne : des auteurs ont réalisé deux tests au synacthène espacés de 24 heures chez 20 patients avec sepsis, 20 patients avec un choc septique, et 20 patients gravement malades sans sepsis [178] ; le coefficient de corrélation entre les deux tests réalisés dans ce dernier groupe était faible ( $r=0,40$ ;  $P = 0.08$ ), ce qui signifie qu'une seule évaluation de la fonction surrénale chez ces patients n'était pas la meilleure méthode pour diagnostiquer la dysfonction surrénale. Des résultats similaires étaient rapportés par Bouachour et al. [58]. La raison de cette discordance entre les tests espacés de quelques heures seulement n'a pas été bien documentée mais soulève forcément la question de leur validité. On peut déjà avancer que la contraction volémique fréquemment observée chez les patients septiques hypotendus déclenche la sécrétion d'AVP, qui participe avec la CRH à la stimulation de la synthèse d'ACTH. L'autre élément à prendre en considération pour l'interprétation des tests sera donc le remplissage effectif ou non des patients. Les modifications de la volémie intra-vasculaire influencent les concentrations du cortisol total et cela a bien été montré chez les patients subissant un pontage coronarien sous circulation extra-corporelle [283]. Chez ces patients, l'hématocrite, l'albumine et la CBG baissaient rapidement dans le sérum avec le début de la CEC avec une baisse proportionnelle du cortisol total sérique, alors que les concentrations du cortisol libre restaient élevées et non modifiées. Une fois le pontage coronarien sous CEC terminé, les concentrations de CBG et de cortisol total sérique augmentaient rapidement [283].



Un autre problème concerne les variations inter-individuelles : Les études rapportées chez le sujet « critically ill » montrent une grande dispersion des valeurs du cortisol avant ou après le test au Synacthène. Cette variabilité des concentrations du cortisol total observées chez ces malades peuvent rendre compte des différences intrinsèques inter-individuelles, des différences dans la nature du stress et aussi dans le type de test utilisé. Ces variations ne peuvent permettre actuellement de définir des normes ou des niveaux de concentrations du cortisol total sérique pour un stress donné. Une des raisons de cette grande variabilité pourrait être en rapport avec le polymorphisme des *toll -like* récepteurs [8, 179]. De même, le polymorphisme des récepteurs aux glucocorticoïdes pourrait contribuer aux variations observées du cortisol entre les individus [83, 329]. On ne sait pas si des polymorphismes des récepteurs de l'ACTH ou de la CRH pourraient contribuer à ces variations du cortisol.

Plusieurs médicaments peuvent interférer avec la synthèse des protéines porteuses du cortisol (Ex : oestrogènes) ou du cortisol (Ex : kétoconazole, étomidate), ou avoir un effet inhibiteur direct sur la sécrétion de CRH et d'ACTH (Ex : tous les glucocorticoïdes oraux, intra-dermiques, oculaires ou inhalés). Certains médicaments ont un effet anti-glucocorticoïde (Ex : le RU486) tandis que d'autres ont une activité mimant les glucocorticoïdes (Ex : la médroxyprogestérone, mégestrol) [269]. L'étomidate est un médicament hypnotique très utilisé en anesthésie pour faciliter les intubations trachéales en urgence souvent dans des situations de stress intense nécessitant une augmentation des besoins en cortisol. Paradoxalement, il a été constaté chez ces patients une faible réponse au test au Synacthène avec un rôle possible de l'étomidate dans la genèse de la dysfonction surrénale quel que soit son mode d'administration, en continu ou en injection unique [13, 116, 172]. Cet effet est lié à une diminution de la synthèse du cortisol, provoqué par l'inhibition de la 11 $\beta$ -hydroxylase [6, 181, 318, 321]. Les premiers rapports sur l'utilisation prolongée de ce médicament faisait état d'une morbi-mortalité accrue liée à une insuffisance surrénale [321]. Les opinions concernant la poursuite ou non de son utilisation restent controversées. Si ce médicament doit être utilisé, il est préconisé d'administrer durant 24-36 heures de l'hydrocortisone [26]. Le **tableau I** ci-dessous résume les principaux facteurs pouvant faire varier les concentrations du cortisol total sérique

Médicaments	Mécanisme	Impact
Oestrogène	↑ CBG	↑ [C] <sub>total</sub>
Kétoconazole	↓ Σ cortisol	↓ [C] <sub>total</sub>
Aminoglutéthimide		
Ethomidate		
Spironolactone	Interférence avec le dosage	↑ ou ↓ [C] <sub>total</sub>

Facteurs	Mécanisme	Impact
Hépatite	↑ CBG	↑ [C] <sub>total</sub>
Choc septique	Résistance au [C]	↑ [C] <sub>total</sub>
Malnutrition	↓ CBG + albumine	↓ [C] <sub>total</sub> mais [C] <sub>libre</sub> normal
Syndr. Néphrotique		
Dilution		
Cirrhose		

**Tableau I :** Principaux médicaments et conditions pathologiques faisant varier les concentrations du cortisol total.

## 2.1.9) Intérêt de la mesure du cortisol libre

### 2.1.9.1) La CBG ou transcortine

La CBG, également appelée transcortine, est une glycoprotéine monomérique d'environ 52 kDa essentiellement synthétisée par le foie. Elle lie avec une haute affinité le cortisol (mais également la progestérone) dans le plasma, ce qui lui confère un rôle déterminant dans l'activité biologique de cette hormone [63, 90, 109, 205]. Sa capacité maximale de liaison est cependant faible et facilement saturable aux conditions physiologiques: elle est atteinte pour des valeurs physiologiques de cortisol (600-700 nmol/L).

Les mécanismes proposés pour expliquer la baisse des taux de CBG pendant le stress comme le sepsis sont : une clairance métabolique accrue, une diminution de la synthèse hépatique, une fuite capillaire ou le clivage de la CBG par l'élastase produite par les polynucléaires neutrophiles activés au site de l'inflammation [141, 231, 243]. Au cours du sepsis, les concentrations de CBG peuvent chuter de 50% laissant libre dans le sérum une grande quantité de cortisol disponible pour la cellule [187]. A l'inverse de la CBG, l'albumine représente un système de grande capacité mais de faible affinité. Environ 80% du cortisol circulant est lié à la CBG et 10% à l'albumine, tandis que les 10% restant représente la forme libre [52]. La CBG contrôle la quantité de cortisol libre sérique et aide aussi l'entrée du cortisol dans la cellule [243]. Les déficits génétiques en CBG sont rares et les variations des concentrations en CBG sont principalement liées aux maladies du foie, au syndrome néphrotique, à l'hypothyroïdie, à l'obésité ou à des traitements comme les oestrogènes [90, 140, 255].

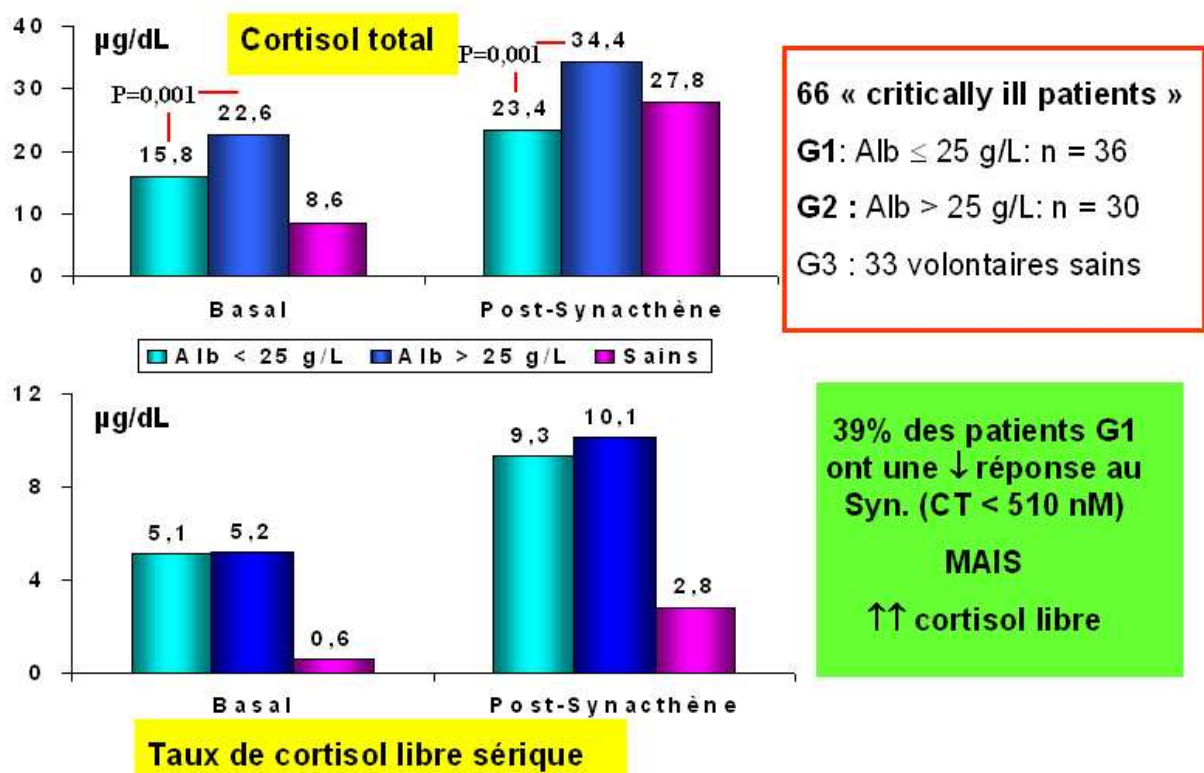
Beishuizen et al. [38] ont analysé les variations de concentrations en CBG chez 30 patients en choc septique, 8 patients polytraumatisés et 40 volontaires sains. Les auteurs observaient des taux extrêmement bas de CBG à la phase aiguë du stress, probablement en rapport avec les taux élevés d'IL-6, puisque cette cytokine peut inhiber la synthèse in vitro de CBG dans une lignée de cellule G2 d'hépatome [36, 110]. Les taux de CBG se normalisaient en 7 à 8 jours.

### **2.1.9.2) Le cortisol libre sérique**

Le concept de fraction hormonale libre active constitue un véritable dogme de l'endocrinologie, puisque c'est la fraction libre qui se lie au récepteur et qui produit son effet [240]. Les protéines porteuses plasmatiques (CBG et albumine) jouent un rôle important dans le maintien d'une réserve constante en hormone pour les tissus en libérant l'hormone libre en cas de besoin. La liaison de l'hormone aux protéines porteuses est en effet réversible et suit la loi d'action de masse : à l'état d'équilibre le taux de dissociation des hormones stéroïdiennes aux protéines plasmatiques est égal au taux d'association, et la proportion d'hormone liée est dictée par la constante d'affinité et la concentration de chaque protéine liante.

Le dosage du cortisol libre sérique permet de ne plus dépendre de la concentration plasmatique de la CBG et/ou de l'albumine, modifiées au cours de nombreuses situations et dont les fluctuations se répercutent immédiatement sur la cortisolémie totale : la grossesse, les estrogènes à doses fortes (contraception oestro-progestative) stimulent la synthèse

hépatique de la CBG. A l'inverse, la concentration de CBG est diminuée au cours des hypothyroïdies, des néphropathies avec fuite protéique urinaire, des chocs septiques et en cas d'excès de glucocorticoïdes endogènes (syndrome de Cushing) ou exogènes, et de l'insuffisance hépatocellulaire [243]. Une étude récente réalisée chez des patients non cirrhotiques en situation de stress a bien montré l'influence que peut avoir la baisse des protéines porteuses sur les concentrations du cortisol total sérique [142]; les auteurs observaient des taux de cortisol total sérique anormaux chez 40% des patients ayant une albuminémie < 25 g/L alors que les taux sériques de cortisol libre sérique étaient similaires avant et après Synacthène® dans les deux groupes de patients hypo- et normo-albuminémique (figure VI ci-dessous).



**Figure VI :** Variation des concentrations de cortisol selon la concentration d'albumine. Surestimation de l'insuffisance surrénale avec le dosage du cortisol total sérique. L'augmentation des concentrations du cortisol libre sérique est indépendante de l'albuminémie. 1 µg/dl de cortisol équivaut à 27,6 nmol/L.

Actuellement, il n'existe pas de méthode permettant un dosage direct du cortisol libre dans le sérum. La mesure du cortisol libre nécessite une séparation préalable de la fraction libre au moyen d'une dialyse ou d'une ultrafiltration. La détermination de cette fraction peut se faire de deux manières : par dosage dans l'échantillon filtré (technique de type

immunologique ou spectrométrique) ou par quantification de la filtration simultanée d'une faible quantité de cortisol tritié et en rapportant à la cortisolémie totale. Nous ne détaillerons pas ces techniques bien illustrées dans la revue générale de Dolomie et al., et résumées dans Le **Tableau II** avec la permission de l'auteur [105].

<b>Techniques reposant sur la séparation du cortisol libre</b>		
<b>Mode de séparation</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Dialyse à l'équilibre	Technique fiable et considérée comme la méthode de référence	Relativement coûteux Incubation longue (16-24 h) Nécessité de ne pas perturber l'équilibre hormone-protéine de liaison Non adapté à un dosage en routine
Ultracentrifugation	Equivalente à la dialyse à l'équilibre Simple à réaliser Rapide (< 30 min de centrifugation)	Relativement coûteux Risque d'adsorption du cortisol sur la membrane d'ultrafiltration Nécessité d'une centrifugeuse thermostatée (contrôle de la température à 37 °C)
<b>Méthode de dosage</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Dosage direct : immunologique ou spectrométrique	Possibilité de travailler avec une méthode « froide » rapide	Dépend de la sensibilité de la trousse ou de l'automate de dosage du cortisol (faibles concentrations de cortisol libre)
Quantification par mesure de la répartition du cortisol tritié	Reproductible et sensible	Impuretés du cortisol tritié qui peuvent se lier à l'hormone ou à la CBG Nécessite au préalable pour l'ultrafiltration la mise en équilibre du cortisol tritié avec le sérum (30 à 60 min) Dépend des performances du dosage de cortisol total Contraintes liées à l'utilisation de radioéléments

**Tableau II** : Techniques de séparation et de dosage du cortisol libre. Tableau modifié d'après Dolomie et al. [105].

### 2.1.9.3) Le cortisol salivaire

La salive est un fluide complexe comprenant des sécrétions des glandes salivaires et bronchiques et des sécrétions de la muqueuse nasale, le tout mélangé à des micro-organismes et des particules alimentaires [167]. La composition et la consistance de la salive peuvent varier de façon importante d'un individu à l'autre, chez la même personne mais aussi en fonction de l'activité physique [125, 234]. Le cortisol salivaire centrifugé est stable après 5 jours passé à 4°C et jusqu'à 3 mois à -20°C [124, 128]. Plusieurs dispositifs sont disponibles pour le recueil salivaire et son dosage [135, 328]. Les dispositifs les plus

utilisés sont la Salivette<sup>®</sup> (Sarstedt), le Quantisal<sup>®</sup> (Immunoanalysis), et le SCS<sup>®</sup> (Greiner-BioOne) [135].

La mesure du cortisol libre salivaire est une approche séduisante pour déterminer la concentration de cortisol libre et son dosage a déjà été évalué dans des situations différentes comme l'insuffisance rénale chronique ou pour le dépistage du syndrome de Cushing [233]. Le cortisol salivaire diffuse librement à travers les cellules acineuses des glandes salivaires avec un flux salivaire sensiblement constant [314]. Le cortisol salivaire est en équilibre avec le cortisol libre sérique et cet équilibre des concentrations sériques et salivaires apparaît en quelques minutes. Les glandes salivaires peuvent métaboliser les stéroïdes en utilisant l'enzyme 11-bêta-hydroxy-stéroïde-déshydrogénase (11 $\beta$ -HSD) de type 2, qui convertit le cortisol (forme biologiquement active) en cortisone inactive (cf *chapitre 2.1.11*). Cela entraîne une baisse des concentrations du cortisol salivaire de 50-60% par rapport aux concentrations du cortisol libre. Toutefois, les concentrations élevées de cytokines pro-inflammatoires observées chez les patients cirrhotiques peuvent altérer l'activité de la 11 $\beta$ -HSD de type 2 [91]. Comme cela est observé avec le cortisol libre sérique, l'augmentation des concentrations de cortisol salivaire est plus rapide lorsque la CBG est saturée.

Une étude a évalué le cortisol salivaire et le cortisol libre sérique chez 51 patients « critically ill » (maladie du foie exclus) divisés en deux groupes selon la concentration d'albumine sérique [groupe 1 :  $\leq 25$  g/L, et groupe 2  $> 25$  g/L ; d'après [27]]. Les auteurs ont montré que les concentrations du cortisol salivaire et libre sérique étaient bien corrélées entre-elles quelle que soit la concentration d'albumine. Les concentrations du cortisol total sérique des patients du groupe 1 étaient significativement plus basses que celles des patients du groupe 2 ayant une maladie de sévérité identique, alors que ces deux groupes avaient une élévation similaire du cortisol salivaire et du cortisol libre sérique. Cette étude confirme que le cortisol total surestime le diagnostic d'insuffisance surrénale chez les patients ayant une hypoalbuminémie.

	<b>Sujets « sains » (n = 31)</b>	<b>G1 : Alb &lt; 25 g/L (n = 22)</b>	<b>G2 : Alb &gt; 25 g/L (n = 29)</b>	<b>« p » G1 vs G2</b>
<b>T0 CTS</b>	<b>8,1 ± 3,6</b>	<b>14,2 ± 6,7</b>	<b>21,1 ± 7,8</b>	<b>0,03</b>
<b>CTS post Syn.</b>	<b>28,2 ± 6</b>	<b>27,8 ± 10,2</b>	<b>38,4 ± 9,5</b>	<b>&lt; 0,001</b>
<b>T0 CLS</b>	<b>0,76 ± 0,4</b>	<b>3,72 ± 2,68</b>	<b>3,17 ± 1,75</b>	<b>NS</b>
<b>CLS post Syn.</b>	<b>3,29 ± 1,51</b>	<b>8,73 ± 5,27</b>	<b>8,18 ± 4,11</b>	<b>NS</b>
<b>T0 CSaliv</b>	<b>0,19 ± 0,11</b>	<b>1,47 ± 1,03</b>	<b>1,16 ± 0,89</b>	<b>NS</b>
<b>CSaliv post Syn.</b>	<b>1,49 ± 0,74</b>	<b>3,53 ± 1,75</b>	<b>3,84 ± 1,89</b>	<b>NS</b>

**Tableau III:** Variation du cortisol total sérique (CTS), libre sérique (CLS) et salivaire (CSaliv) selon l'albuminémie. A l'inverse du CTS, les concentrations du cortisol salivaire et du cortisol libre sérique augmentent de façon similaire, indépendamment de l'albumine avant (T<sub>0</sub>) et après Synacthène. Les unités de cortisol sont en µg/dL (1 µg/dL = 27,6 nmol/L).

**Le recueil salivaire présente de nombreux avantages [26, 328]** : 1) l'absence de ponction veineuse élimine un petit stress constant qui suffit à augmenter artificiellement la production de cortisol, 2) le test permet de réaliser ce dosage dans un laboratoire non spécialisé avec un résultat rapide (< 3 heures) et donc adapté aux situations d'urgence, 3) il existe une corrélation forte entre les concentrations de cortisol salivaire et de cortisol sérique, et 4) du fait de l'absence de protéines porteuse du cortisol dans la salive, le cortisol salivaire mesuré représente l'hormone biologiquement active, tout comme le cortisol libre sérique.

**Les limites peuvent être secondaires à quatre types de facteurs :**

1) une quantité insuffisante de salive. La fréquence de l'insuffisance de recueil salivaire varie de 1% (dans notre expérience) à 40% [88]. Elle dépend étroitement de la population concernée. Dans l'étude de Cohen et al., les prélèvements salivaires étaient réalisés chez des patients septiques inconscients [88] alors que dans notre étude, il s'agissait de patients conscients.

2) Les concentrations de cortisol salivaire peuvent être modifiées artificiellement par les saignements buccaux (le brossage des dents est à proscrire 30 minutes avant le recueil salivaire) ou par l'utilisation non contrôlée de crèmes à base de corticoïdes. Les infections

bactériennes ou candidosiques et la sécheresse buccale conduisent à sous-évaluer les concentrations de cortisol salivaire. Ces limites « locales » de la technique en apparence négligeables ont l'inconvénient de se rencontrer essentiellement chez les sujets gravement malades (notamment les patients intubés), chez lesquels le test serait particulièrement utile.

3) Certains médicaments ou des compléments alimentaires contenant de l'acide glycyrrhétinique, un inhibiteur de la 11 $\beta$ -HSD de type 2, peuvent augmenter les concentrations de cortisol salivaire.

4) Il n'existe pas de standardisation des méthodes de prélèvements de la salive et des procédures pré-analytiques pour l'obtention de résultats précis et reproductibles des concentrations du cortisol salivaire. Cet inconvénient majeur a bien été montré chez 13 volontaires sains ayant fourni chacun 10 mL de salive analysée par 5 méthodes différentes : un dispositif avec et un autre sans « congélation-décongélation » de la salive avant centrifugation, un dispositif utilisant un filtre membranaire pour éliminer les impuretés de la salive, la salivette<sup>®</sup> (Sarstedt) et un dispositif de prélèvement en mousse [31]. Chaque prélèvement était tripliqué pour le dosage du cortisol par une méthode classique radio-immunologique. Les plus fortes concentrations de cortisol étaient observées avec la salivette<sup>®</sup> et le dispositif utilisant un filtre membranaire. Ainsi, les concentrations de cortisol salivaire augmentaient de 64% par rapport à la méthode avec « congélation-décongélation ». La conclusion brute de cette étude était qu'aucune méthode n'était optimale pour le dosage du cortisol salivaire. La stimulation de la sécrétion salivaire par l'acide citrique peut aussi altérer le dosage du cortisol [311]. Toutefois, il a été récemment montré que l'utilisation de l'acide citrique ne perturbait pas les taux de cortisol salivaire sur des prélèvements réalisés avec des salivettes en coton ou un dispositif en polyester comparativement à des prélèvements de salive obtenu sans dispositif [159]. Par ailleurs, le dosage du cortisol salivaire reposait initialement sur une méthode radio-immunologique. Celle-ci a été remplacée actuellement par des méthodes ELISA non radioactive, ou par de nouvelles techniques comme la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse [135]. Quelle que soit la méthode utilisée, les résultats doivent être interprétés avec précaution du fait des variations des valeurs de référence affichées entre les laboratoires qui utilisent soit des tests différents, soit des tests identiques [33, 71, 218]. Les valeurs du cortisol salivaire dépendent beaucoup des réactions croisées des anticorps entre le cortisol et la cortisone, qui peut avoir une concentration supérieure de 3 fois celle du cortisol [173]. Actuellement nous ne disposons pas de test universel pour le dosage du cortisol salivaire mais seulement des tests « maison », obligeant chaque laboratoire à établir ses propres valeurs de référence. Il faut également se rappeler que la plupart des références des tests commercialisés ont été établies à partir de sujets sains, sans prendre en compte les effets potentiels de l'âge, du sexe et d'autres conditions spécifiques comme la cirrhose.



## **2.1.10) Estimateurs du cortisol libre sérique**

Le dosage du cortisol libre sérique ne peut être réalisé actuellement en routine du fait de sa complexité et de son coût. De plus, les résultats de ce test spécialisé ne peuvent être délivrés dans l'urgence et ne sont donc pas très utiles aux décisions cliniques. Certains auteurs ont donc établi des formules mathématiques pour estimer indirectement les concentrations sériques du cortisol libre, à partir du cortisol total et des protéines porteuses du cortisol.

### **2.1.10.1) Index du cortisol libre sérique**

Le Roux et al. ont observé une baisse significative des concentrations sériques de la CBG dans la période post-opératoire de leurs patients, en partie liée à l'administration importante de soluté de remplissage durant l'intervention [170, 171]; cette observation s'accompagnait d'une baisse des concentrations du cortisol total sérique pouvant conduire au diagnostic erroné d'insuffisance surrénale. Ces auteurs ont donc calculé un « index de cortisol libre » (ICL), pour corriger la baisse de la CBG, en divisant la concentration du cortisol total sérique par celle de la CBG. D'autres auteurs ont fait les mêmes observations chez des traumatisés ou des patients septiques [38, 52].

Dhillon et al. [100] ont étudié la réponse au test au Synacthène 250 µg chez 30 volontaires sains. Ces auteurs notaient une forte corrélation entre les valeurs de la CBG et les concentrations du cortisol total avant et après Synacthène. Une dysfonction surrénale (cortisol total à 30 min < 550 nmol/L) était suspectée chez 13 sujets malgré une augmentation adéquate entre minuit et le matin du ratio cortisol/créatinine urinaire (ce ratio est bien corrélé au cortisol libre [52]). Ces auteurs corrigeaient les variations de la CBG par le ratio cortisol/CBG qui n'affichait plus cette fois de différence (ratio toujours > 12) entre les sujets ayant une réponse faible et ceux ayant une réponse normale au Synacthène. Chez 23 volontaires sains, l'ICL était fortement corrélé avec le cortisol libre sérique ( $r=0.90$ ;  $P<0.001$ ), et l'ICL réalisé 30 min. après le test au Synacthène (250 µg) était constamment > 11,9 [171]. Ainsi, ces auteurs considéraient qu'un ICL  $\geq 12$  après Synacthène était le garant d'une fonction surrénale adéquate. Les mêmes auteurs confirmaient ces résultats chez 31 patients opérés avec tous un ICL post-opératoire  $\geq 13$  malgré une réponse anormale du test au

Synacthène à 250 µg chez 7 patients [170]. Une bonne corrélation entre l'ICL et le cortisol salivaire a aussi été rapportée chez les sujets sains [52].

Une étude récente observait aussi une discordance entre l'ICL et le dosage du cortisol total sérique dans le diagnostic d'insuffisance surrénale chez 26 patients ayant une atteinte hépatique aiguë ou chronique [313] : 46% des patients avait une réponse anormale au Synacthène liée à des concentrations basses de CBG, malgré un ICL  $\geq 12$ .

Principaux inconvénients de l'ICL : L'ICL ne prend pas en compte l'albuminémie souvent basse au cours des maladies du foie. Des auteurs ont ainsi observé une augmentation de 400% du cortisol libre chez des patients venant de recevoir un stress opératoire alors que l'ICL augmentait seulement de 130%, soulignant le fait que les taux sériques d'albumine avaient un impact certain sur les concentrations du cortisol libre [81].

Cet index ne fournit pas directement une mesure du cortisol libre et s'exprime en nmol/mg. C'est pourquoi il est davantage utilisé comme un indicateur ou un facteur de correction dans l'interprétation du cortisol total que comme une méthode quantitative d'estimation du cortisol libre. Son utilisation dans la cirrhose n'a pas été analysée en détail.

### **2.1.10.2) Equation quadratique de Coolens et al.**

L'équation proposée par Coolens et al. peut être facilement utilisée par des logiciels de calcul standards (comme Microsoft Excel) ; Elle est fonction de la cortisolémie totale, de la concentration en CBG, et de valeurs prédéfinies telles que la constante d'affinité du cortisol pour la CBG à 37°C ( $3,10^7 \text{ M}^{-1}$ ) et du ratio (N) du cortisol lié à l'albumine sur le cortisol libre (N= 1,74), la concentration en albumine étant supposée avoir une faible contribution dans la liaison du cortisol [90]. Ce calcul a été validé par les mêmes auteurs en obtenant dans une population de sujets présentant des concentrations variables de CBG un coefficient de corrélation égal à 0,97 par rapport à une technique par ultrafiltration pour des cortisolémies de base (matinales). L'équation proposée par Coolens et al. est la suivante : si U, T et C sont respectivement les concentrations en µmol/L du cortisol libre, du cortisol total, et de la CBG :  $U^2 \times K(1+N) + U \times [1+N+K(C-T)] - T = 0$ .

Les limites de cette méthode de mesure sont : 1) l'existence d'un variant génétique de CBG à affinité réduite, 2) les états pathologiques présentant une diminution de cette affinité tel le choc septique et la présence de concentrations anormales d'albumine (élevées ou basses), puisque seule est prise en considération l'interaction du cortisol avec la CBG. D'autre part, cette dernière condition impliquerait également qu'en cas de taux anormalement élevés d'une autre hormone compétitive (grossesse ou hyperplasie

congénitale des surrénales) pouvant interférer sur l'équilibre de liaison, cette équation ne puisse pas être appliquée.

Compte tenu des difficultés pour obtenir le cortisol libre par une méthode de référence, plusieurs publications ont utilisé cette formule pour apprécier la fonction surrénale. L'équipe de la Pitié-Salpêtrière (Paris) trouvait une excellente corrélation ( $r=0.91$ ) entre le cortisol salivaire et le cortisol libre calculée par la formule de Coolens chez des patients cirrhotiques hémodynamiquement stables [124]. De même, des auteurs australiens observaient une forte corrélation ( $r=0.66$ ) entre le cortisol libre sérique mesuré et le cortisol libre calculée chez 43 patients cirrhotiques [281], mais la comparaison par la méthode de Bland et Altman [46] des concentrations du cortisol libre mesuré et calculé montrait une concordance faible. La formule de Coolens surestimait significativement le cortisol libre mesurée (16,4 vs 10,9 nmol/L;  $p=0,003$ ) [281]. A l'inverse, d'autres auteurs observaient une sous-estimation de cette formule pour l'estimation du cortisol libre mesuré que ce soit dans le cadre d'une maladie du foie ou non [35, 316].

Ces différences marquées des concentrations du cortisol libre mesuré et calculé sont probablement liées à la simplification de l'équilibre de liaison entre le cortisol et les protéines, aux hypothèses formulées pour les constantes d'affinité, et enfin à l'absence de considération pour d'éventuels autres ligands (précurseurs du cortisol) pouvant entrer en compétition avec le cortisol pour ses protéines porteuses, notamment lors des sepsis (présence d'une plus grande quantité de précurseurs du cortisol dans ce contexte). Ces différences vont s'observer surtout dans les situations où la proportion de cortisol libre augmente, c'est-à-dire toutes les situations où la CBG sera rapidement saturée (notamment dans la cirrhose par défaut de production de la CBG).

Fede et al. ont aussi utilisé la formule de Coolens dans un sous-groupe de 41 patients cirrhotiques et observaient des valeurs de cortisol libre calculé plus faibles chez leurs patients suspects d'avoir une dysfonction surrénale (dysfonction jugée sur un pic de cortisol total  $< 497$  nmol/L =  $18$  µg/L après Synacthène) par rapport aux autres patients [115]. Toutefois, aucune mesure du cortisol libre n'était disponible pour affirmer leur résultat.

En dehors de la cirrhose, des auteurs ont comparés les concentrations de cortisol total et de cortisol libre avant et après Synacthène chez des patients en sepsis, en choc septique et chez des volontaires sains [147]. Dans cette étude, l'équation de Coolens était un estimateur fiable du cortisol libre mesuré, même si certains patients avaient une hypoalbuminémie. Les différences observées dans les résultats des différentes études peuvent être liées à : 1) l'hétérogénéité des méthodes de dosage du cortisol libre. Les premières publications utilisaient une méthode d'ultrafiltration rapide plus souvent sujette à des artefacts que la méthode de dialyse à l'équilibre. 2) l'hétérogénéité des groupes de

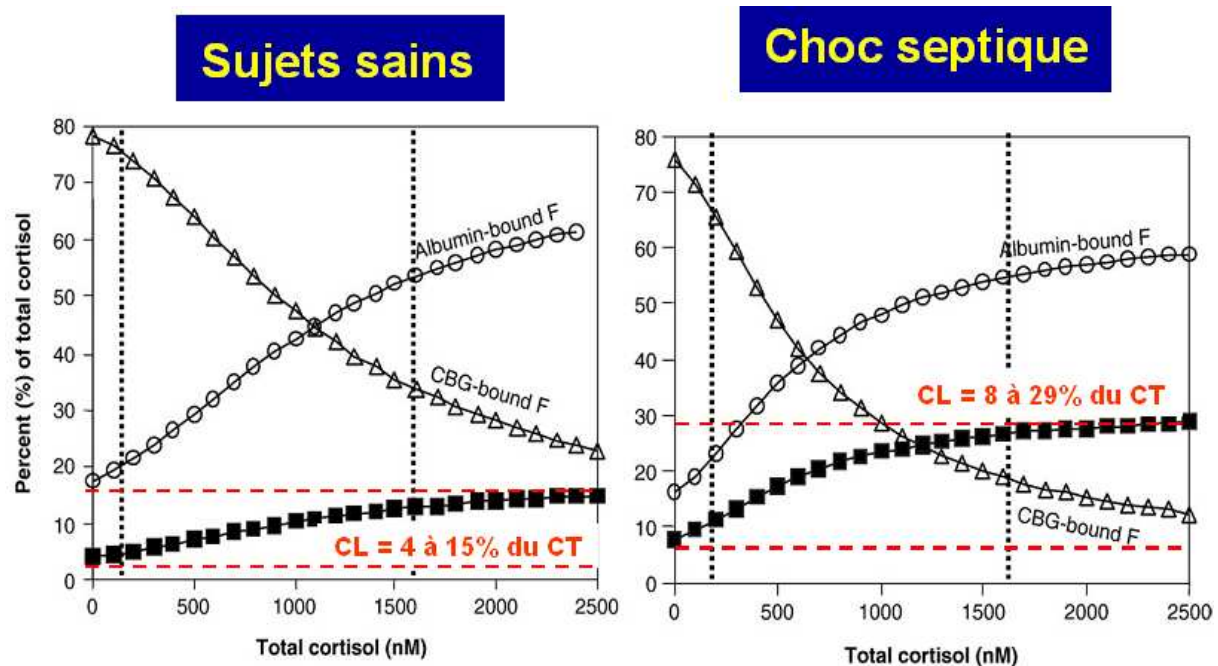
patients étudiés; par exemple, il est bien connu que l'alcool induit une hyperactivité de la fonction surrénale [160], mais la proportion de buveurs excessifs est rarement rapporté dans les études publiées. Cet excès de cortisol chez le patient alcoolique peut être lié à une baisse de la clairance du cortisol par inactivation de la 11- $\beta$ -HSD de type 2, enzyme présente au niveau rénal et hépatique catalysant l'oxydation du cortisol en cortisone [276, 303].

Techniques reposant sur un calcul		
	Avantages	Inconvénients
Index du cortisol libre (ratio cortisolémie totale / concentration de CBG)	Simple	Ne tient pas compte des variations de l'albuminémie Dépend étroitement de la fiabilité du dosage du cortisol total et de la CBG Méthodes actuelles de dosage de la CBG non adaptées à l'urgence
Equation de Coolens	Simple Bonne corrélation avec les valeurs de cortisol libre dosé avec des techniques de séparation	Limites de l'équation en présence de : - concentrations anormales d'albumine - d'une CBG à affinité réduite - de taux élevés d'une autre hormone compétitive Dépend étroitement de la fiabilité du dosage du cortisol total et de la CBG Intervalles de référence non standardisés Méthodes actuelles de dosage de la CBG non adaptées à l'urgence

**Tableau IV** : Estimateurs du cortisol libre, d'après Dolomie et al. [105]

### 2.1.10.3) Equation cubique de Dorin et al.

Dorin et al. ont développé une équation cubique utilisant les valeurs *mesurées* (plutôt que celles supposées) de l'albuminémie [107]. De plus, la constante de dissociation du cortisol pour l'albumine ( $K_A$ ) était considérée comme une variable indépendante. Comparé au cortisol libre mesuré, cette équation cubique donnait une estimation moins biaisée du cortisol libre que l'équation de Coolens (biais : -23% vs -41%) chez 64 patients septiques et chez 10 volontaires sains. Ce modèle souligne l'importance du rôle de la liaison cortisol/albumine et de l'hypoalbuminémie dans l'augmentation du cortisol libre sérique, surtout chez les patients en choc septique. Cette équation prédisait bien l'importance des faibles concentrations de CBG et d'albumine contribuant à l'augmentation du cortisol libre sérique, comme chez le sujet cirrhotique. Ces résultats permettent de mieux comprendre pourquoi le cortisol total sérique, qui est dépendant des concentrations de CBG et d'albumine, est un mauvais estimateur de la fonction surrénale (**Figure VII**).



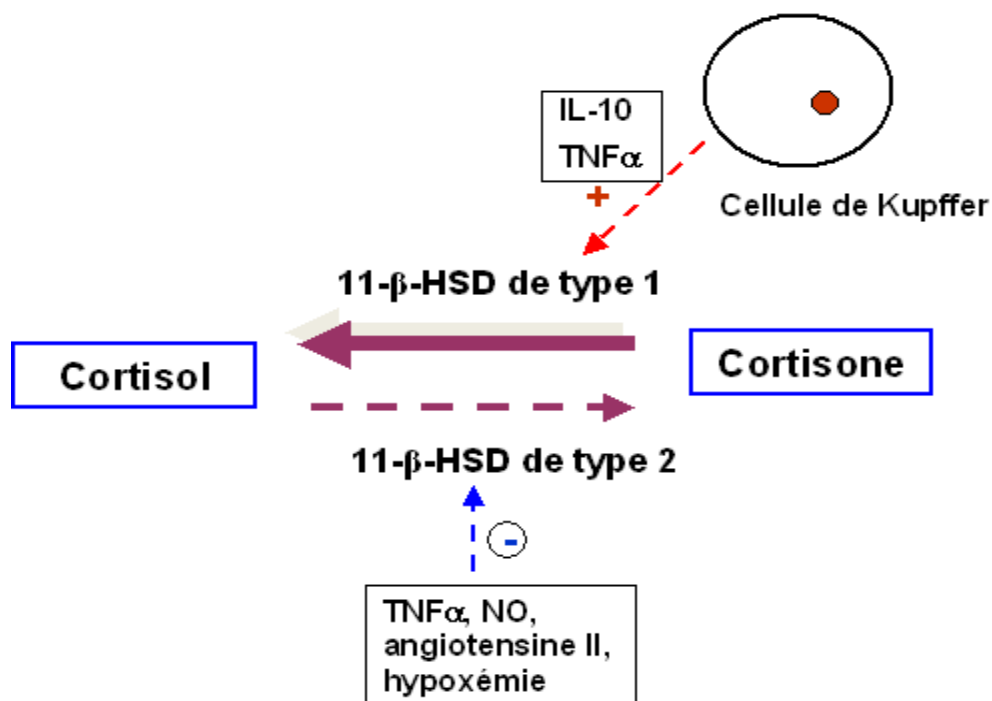
**Figure VII :** Variation des concentrations du cortisol libre et lié chez le sujet sain et septique, d'après Dorin et al. [107]. Dans le choc septique, les concentrations d'albumine et de CBG baissent et ces deux protéines sont plus rapidement saturées contribuant à l'augmentation de la fraction libre (CL) du cortisol total (CT) sérique.

### 2.1.11) Cortisol et 11-bêta-hydroxy-stéroïde-déshydrogénase

L'induction de la 11- $\beta$ -HSD de type 1, enzyme convertissant la cortisone en cortisol dans le foie et le tissu adipeux, en réponse à une atteinte hépatique et une inflammation représente un mécanisme de défense, avec la production locale de cortisol pouvant limiter les dommages tissulaires liés à l'inflammation. L'effet hépato-protecteur de la production locale de cortisol est médié par la synthèse intra-hépatique d'IL-10 par les cellules de Kupffer [279]. Les cellules de Kupffer produisent d'autres cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6) et du NO ; la synthèse de ces cytokines est directement inhibée par les glucocorticoïdes au niveau de la stabilité de l'ARNm et des gènes transcriptionnels, mais aussi par l'inhibition de la production de facteurs de transcription pro-inflammatoire comme le facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ou la protéine activatrice-1 (AP-1) [91]. Des études complémentaires sont nécessaires pour étudier la relation entre

l'atteinte hépatique, l'induction de la 11- $\beta$ -HSD de type 1 et les effets anti-inflammatoires au niveau de la cellule hépatique des glucocorticoïdes. Cependant, l'induction de la 11- $\beta$ -HSD de type 1 dans le foie et dans le reste de l'organisme pourrait avoir des effets délétères surpassant les effets bénéfiques intra-hépatiques. Ainsi, l'activité de la 11- $\beta$ -HSD de type 1 peut contribuer à l'installation du syndrome métabolique [319]. Actuellement la recherche s'intéresse aux inhibiteurs de cette enzyme qui permettraient d'améliorer la tolérance au glucose et de réduire le poids de souris obèses et diabétiques [10, 44, 146].

Dans la cirrhose, il existe un état pro-inflammatoire qui se traduit par une forte concentration sérique de cytokines pro-inflammatoires, comme le  $\text{TNF}\alpha$  [245, 284]. Le  $\text{TNF}\alpha$  peut stimuler l'activité de la 11- $\beta$ -HSD de type 1 et augmenter ainsi la production de cortisol au niveau cellulaire [111]. De plus, le  $\text{TNF}\alpha$  peut diminuer l'activité de la 11- $\beta$ -HSD de type 2, enzyme essentiellement localisé au rein et à l'intestin qui convertit le cortisol en cortisone [123]. D'autres acteurs sur-exprimés ou fréquemment observés dans la cirrhose participent à l'augmentation du cortisol cellulaire en diminuant l'activité de la 11- $\beta$ -HSD de type 2, comme le monoxyde d'azote (le « NO »), l'angiotensine II et l'hypoxémie [145, 168, 278]. Ainsi, dans la cirrhose, beaucoup d'arguments plaident en faveur d'une sur-production de cortisol au niveau cellulaire selon la **figure VIII** suivante :



**Figure VIII :** Mécanismes intriqués participant à l'augmentation du cortisol intracellulaire.

## 2.1.12) Corticoïdes et sepsis

### 2.1.12.1) Le cortisol au cours du stress

Le stress est un ensemble de réponses non spécifiques de l'organisme à une situation telle que les mécanismes de défense de l'organisme sont dépassés ou risquent de l'être. Plusieurs stimuli nocifs peuvent être à l'origine du stress : physiques (traumatisme, intervention chirurgicale, exposition au froid ou au chaud), chimiques (manque d'oxygène), physiologiques (douleur, exercice intense), psychosociaux (conflits, anxiété,...) [153].

Les patients de réanimation ou les patients cirrhotiques les plus graves sont soumis à un stress quasi-constant surtout par le biais des infections. Les corticoïdes sont les principaux médiateurs de la réponse au stress. Lors d'un événement stressant, il y a une stimulation hypothalamique par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) permettant la synthèse de CRH, puis l'augmentation immédiate de la sécrétion d'ACTH, rapidement suivie par une augmentation du taux de cortisol [92, 166]. En complément de l'augmentation de production de cortisol lors du stress, il existe une diminution de la clairance [194]. De plus, le taux de CBG diminue rapidement, ce qui permet d'augmenter la fraction libre du cortisol [38]. Les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle crucial dans l'activation de l'axe corticotrope [122]. Ces événements sont associés à une perte du rythme circadien de la sécrétion du cortisol secondaire à une augmentation de la production de CRH et de l'ACTH provoquée par les cytokines pro-inflammatoires, la stimulation vagale et la diminution du rétrocontrôle négatif exercé par le cortisol [166]. Cette perte du rétrocontrôle négatif exercé par le cortisol est connue et bien démontrée par des expériences d'administration intra-veineuse de dexaméthasone [228, 236]. Enfin, ces cytokines accroissent l'affinité du cortisol à ses récepteurs [92].

A côté de l'ACTH, d'autres facteurs peuvent moduler l'axe HHS comme l'AVP, l'endothéline, le facteur natriurétique auriculaire (FAN) [310] ou le facteur inhibiteur de la migration macrophagique [37, 66]. On sait aussi qu'il existe des récepteurs de l'immunité innée, appelés *toll-like* récepteurs (TLR), sur les cellules du cortex surrénalien [80, 162]. Classiquement situé sur les cellules du système immunitaire, les TLR reconnaissent des structures particulières exogènes sur les micro-organismes (les « *pathogen associated molecular pattern* ») et des structures endogènes (les « *damage-associated molecular patterns* »). Ils ont pour fonction primaire la reconnaissance des pathogènes et l'activation de la cellule qui les porte contribuant à l'activation des cellules de l'inflammation et de l'immunité adaptative. Le rôle des TLR sur les cellules du cortex surrénalien n'est pas très bien identifié

mais le polymorphisme de ces TLR pourrait rendre compte de la variabilité de la réponse au stress.

Lorsque le stress est intense (sepsis sévère ou choc septique), il peut y avoir une résistance aux corticoïdes par un niveau de concentrations de cytokines pro-inflammatoires trop excessif conduisant à réduire le nombre et l'affinité des récepteurs au cortisol [199] mais aussi à altérer le signal post-récepteur.

Durant la phase aiguë du stress, l'axe HHS est principalement stimulé par la CRH et les cytokines pro-inflammatoires. L'augmentation de l'ACTH et l'hypercortisolisme qui en résulte a pour but de maintenir l'homéostasie de l'organisme avec une redistribution du glucose vers les cellules « insulino-dépendantes », le maintien d'une réactivité vasculaire normale, et une inhibition de presque toutes les composantes de la cascade inflammatoire. Lorsque le sepsis se prolonge, les concentrations plasmatiques d'ACTH baissent malgré la persistance d'une cortisolémie élevée, suggérant que sa sécrétion est régulée par d'autres voies que la CRH (FNA, AVP, endothéline, etc.) [310]. Néanmoins, la capacité de l'axe corticotrope à réagir à une agression inflammatoire prolongée, notamment celle résultant d'une infection sévère, est probablement déterminante dans la progression du sepsis vers le choc septique et le décès. La concentration « normale » de cortisol circulant chez un patient grave n'est pas clairement définie. Le chiffre de 15– 20 µg/dL (414-552 nmol/L) a été proposé [21, 92, 189]. Bien que cela reste controversé, une cortisolémie élevée à l'admission en unité de soins intensifs semble associée à un taux de mortalité supérieur [244]. Le taux sérique de cortisol total semble être un facteur prédictif indépendant de la survenue d'un stress sévère, et probablement un marqueur de la sévérité du stress. Malgré tout, il apparaît plus utile de déterminer la capacité du système endocrinien à répondre à un stress soutenu et par conséquent, l'exploration des surrénales par des tests dynamiques est considérée comme importante pour certains auteurs. Le test le plus approprié en unité de soins intensifs (USI) est le test au Synacthène standard. Habituellement, une élévation de la concentration en cortisol circulant d'au moins 9 µg/dL (250 nmol/L) est considérée comme une réponse normale [22, 244]. Toutefois une récente conférence de consensus américaine conseillait de ne pas utiliser le test au Synacthène pour tenter d'identifier les patients en choc septique nécessitant l'administration de corticoïdes du fait des limites mêmes de ce test dans cette population [187].



## 2.1.12.2) Evaluation de l'axe HHS durant le stress

La plupart des études évaluant l'axe HHS durant un stress intense ont inclus des populations de malades très hétérogènes [61, 119, 142, 154, 186, 202, 225, 239]. La difficulté pour comparer les études entre elles est cette hétérogénéité dans la cause et la durée du stress. Cependant la majorité des études portaient sur le sepsis sévère et le choc septique [17, 21, 32, 38, 59, 62, 158, 188, 222, 238, 244, 254, 268, 273]. Dans ces études, la définition de la dysfonction surrénale n'est pas uniforme, reflétant la difficulté même à définir cette situation dans un contexte septique. La prévalence de la dysfonction surrénale serait plus fréquente au cours du choc septique (20-75%) comparé à d'autres situations (0-25%) (cf. **tableau V** ci-dessous).

Ref	N	Critères d'IS	IS (%)
Rothwell 1991	32	$\Delta_{\max} < 250 \text{ nM}$	19
Moran 1994	68	[C] T0 < 500 nM	32
Bouachour 1995	22	$\Delta_{\max} < 200 \text{ nM}$	75
Soni 1995	21	Pic [C] < 500 nM	24
Briegel 1996	20	$\Delta_{\max} < 200 \text{ mM}$	45
Oppert 2000	22	[C] T0 < 1000 nM + $\Delta_{\max} < 200 \text{ mM}$	55
Annane 2000	189	$\Delta_{\max} < 248 \text{ nM}$	54
Marik 2003	59	[C] T0 < 690 nM	61
Ho 2006	45	$\Delta_{\max} < 248 \text{ nM}$	33

**Tableau V:** Prévalence de l'insuffisance surrénale (IS) dans le choc septique

Une étude récente montrait que les concentrations de cortisol total et libre sérique différaient significativement entre des patients en choc septique, des patients en sepsis et des volontaires sains [147]. Les patients en choc septique avaient des concentrations de cortisol total et libre sérique plus élevées que les autres patients septiques.

Compte tenu de la disparité des tests utilisés pour tenter de définir l'insuffisance surrénale, il est bien difficile de trouver un consensus. Certains auteurs estiment qu'une cortisolémie faite de façon aléatoire entre 15 et 34 µg/dL est un critère de normalité, tandis que d'autres utilisent plus volontiers le delta cortisol, c'est-à-dire la différence des concentrations en cortisol avant et après Synacthène (un delta > 9 µg/dL est considéré comme normal) ou le pic de cortisol post-Synacthène (un pic > 20-25 µg/dL est considéré comme normal). Toutefois, le delta cortisol peut aussi conduire à porter un diagnostic d'insuffisance surrénale par excès ; Widmer et al. trouvaient que 40% de leurs patients gravement malades avaient une suspicion d'insuffisance surrénale (delta cortisol < 9 µg/dL) malgré le fait que tous ces patients guérissaient sans avoir eu recours à une opothérapie substitutive [324].

Nous avons vu que dans le sepsis et surtout le choc septique, les concentrations sériques de CBG chutaient, augmentant ainsi la fraction libre du cortisol [142, 147]. Le delta cortisol total < 9 µg/dL chez ces patients reflète surtout la baisse du taux de CBG, comme cela a bien été montré par les données d'Arafah [26]: parmi leurs patients gravement malades, il était observé plus fréquemment un delta cortisol total < 9 µg/dL en cas d'hypoalbuminémie ( $\leq 25$  g/L) qu'en cas d'albuminémie subnormale (50% vs 29% ;  $P=0,002$ ), alors que les concentrations du cortisol libre sérique dans ces deux groupes de patients étaient similaires. Dans cette étude, 40% des patients ayant une hypoalbuminémie ( $\leq 25$  g/L) avaient un pic de cortisol total < 18,5 µg/dL (500 nmol/L) tandis que tous les autres patients avaient un pic de cortisol total > 20 µg/dL (550 nmol/L). Ainsi, chez les patients ayant une albuminémie > 25 g/L, le pic de cortisol total devrait être > 20 µg/dL à moins d'une vraisemblable dysfonction surrénale. En cas de choc septique, les données actuelles tendent à montrer qu'un delta cortisol total < 9 µg/dL est associé à un excès de mortalité [22, 244].

L'utilisation du dosage du cortisol libre serait particulièrement adaptée pour évaluer la fonction surrénale chez le patient en unité de soins intensifs. A partir de leurs propres données, Arafah et al. estiment qu'un taux basal de cortisol libre sérique devrait être au moins supérieur au taux post-Synacthène de cortisol libre sérique de sujets sains (i.e. > 1,8 µg/dL soit environ 50 nmol/L) [26]. Ainsi, ces auteurs recommandent le seuil basal de 50 nmol/L de cortisol libre sérique pour identifier les patients gravement malades à risque d'insuffisance surrénale. L'étendue des concentrations post-Synacthène du cortisol libre sérique de leurs patients était de 3,1 (85 nmol/L) à 25,6 µg/dL (706 nmol/L) ; les auteurs recommandent le seuil de 85 nmol/L pour définir une réponse normale au Synacthène chez les patients gravement malades (**Figure IX**).

**Seuils de cortisol libre sérique pour suspecter une insuffisance surrénale (IS) chez des sujets en stress intense**

<b>Cortisol libre basal (<math>T_0</math>)</b> IS suspectée si cortisol < 50 nM	<b>Cortisol libre après Synacthène</b> IS suspectée si cortisol < 85 nM
--	--

**Figure IX:** Seuils de cortisol libre définissant l'insuffisance surrénale (IS) chez le sujet gravement malade

Une conférence de consensus américaine a été publiée en 2008 concernant le diagnostic et la prise en charge de la dysfonction surrénale chez les patients en situation de stress [187]. Le panel d'expert recommandait : 1) de ne plus utiliser le terme d'insuffisance surrénale relative mais plutôt la terminologie "critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI)" témoignant d'une activité cortisolique inadéquate au niveau cellulaire compte tenu de la gravité de la maladie. Ce nouveau concept suppose soit une production insuffisante en glucocorticoïde, soit une résistance tissulaire aux glucocorticoïdes ; 2) de définir la dysfonction surrénale par un delta cortisol < 9 µg/dL (250 nmol/L) ou une cortisolémie totale < 10 µg/dL (276 nmol/L) ; 3) de ne pas utiliser le test au Synacthène pour tenter d'identifier les patients nécessitant l'administration de corticoïdes ; 4) envisager la corticothérapie chez les patients qui ne répondent pas ou peu à l'expansion volémique et aux vasopresseurs.

Ces mêmes recommandations peuvent être appliquées aux patients cirrhotiques septiques malgré l'absence de preuves bien fondées.

### **2.1.12.3) Histoire de l'utilisation des corticoïdes au cours du sepsis**

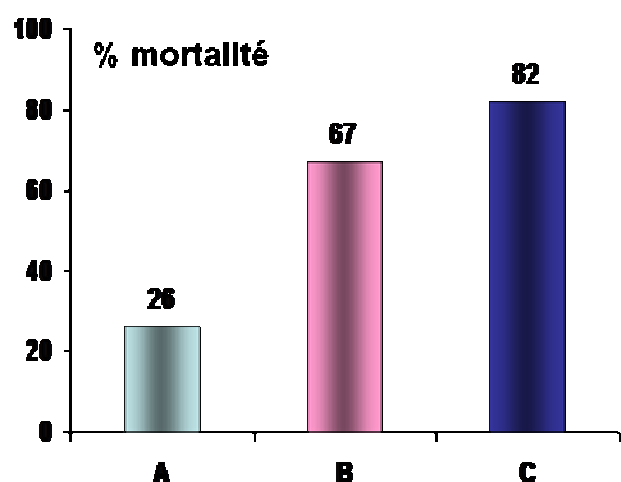
Le puissant rôle anti-inflammatoire des glucocorticoïdes a fait envisager naturellement son utilisation au cours du sepsis. Les effets bénéfiques supposés des corticoïdes étaient une inhibition de la production de cytokines inflammatoires, la prévention

de la migration de cellules inflammatoires dans les tissus [82, 301] et l'amélioration de la réponse aux catécholamines sur le tonus vasculaire. Dans les années 70, les fortes doses de corticoïdes ont été utilisées pour améliorer la survie des patients en état de choc septique [259] et ce traitement intensif a été poursuivi durant une décennie. En 1987, une étude contrôlée randomisée montrait pour la première fois le rôle délétère de l'utilisation de fortes doses de méthylprednisolone (30 mg/kg) chez des patients ayant un sepsis sévère ou un choc septique [3, 50]. Une méta-analyse réalisée quelques années plus tard confirmait l'effet délétère des corticoïdes dans cette situation en augmentant la fréquence des complications infectieuses [94]. Un nouveau concept *d'insuffisance surrénale relative* était établi par Rothwell et al. suite à l'observation que 100% (13/13) des patients en choc septique avec un delta cortisol < 250 nmol/L (test au Synacthène à 250 µg) décédait malgré des concentrations sériques élevées en cortisol avant le test au Synacthène versus 32% (6/19) des patients ayant un delta cortisol > 250 nmol/L [244]. Chez les patients en choc septique, il était observé qu'une diminution du delta cortisol < 250 nmol/L était associée à une réponse vasculaire amoindrie aux vasopresseurs [19] et à une mortalité élevée [17, 19, 48, 202, 244]. L'identification de ce concept d'insuffisance surrénale relative et l'observation d'hémorragies surrénaliennes bilatérales dans des séries autopsiques de choc septique [166, 273], a ravivé l'intérêt de la corticothérapie au cours du choc septique. Annane a ainsi proposé d'administrer de faibles doses de corticoïdes pour traiter le choc septique car il avait noté une association entre le résultat des tests au Synacthène réalisés chez 189 patients en choc septique et le décès [22]. Les patients ayant le moins bon pronostic étaient ceux ayant une cortisolémie basale > 34 µg/dL (940 nmol/L) et un delta cortisol < 9 µg/dL (250 nmol/L) (cf. figure X ci-dessous).

### 3 groupes de patients identifiés

parmi les 189 chocs septiques:

- **A** : "bon pronostic" = cortisol < 34 µg/dL et Δ-cort > 9 µg/dL
- **B** : "intermédiaire" = cortisol < 34 µg/dL et Δ-cort < 9 µg/dL ou [C] à T0 > 34 µg/dL et Δ-cort > 9 µg/dL
- **C** : "mauvais pronostic" = cortisol > 34 µg/dL et Δ-cort < 9 µg/dL



**Figure X:** Pronostic des patients en choc septique selon le delta cortisol et le cortisol basal

Dans un essai contrôlé randomisé en double aveugle, ce même auteur observait une réduction significative de la mortalité chez les patients en choc septique avec une insuffisance surrénale (delta cortisol  $< 9 \mu\text{g/dL}$ ) ayant reçu de l'hydrocortisone (50 mg iv / 6h) et de la fludrocortisone (50  $\mu\text{g/jr}$ ) pendant 7 jours [21] ; les patients avec une insuffisance surrénale relative qui recevaient une corticothérapie pouvaient être sevrés plus rapidement des catécholamines et avaient une médiane de survie plus longue, par rapport aux patients ayant reçu un placebo. Malgré certaines limites de cette étude (68 patients considérés comme non-répondeurs aux corticoïdes avaient reçu de l'étomidate, médicament connu pour inhiber la production du cortisol), cet essai a conduit aux recommandations d'utilisation de l'hydrocortisone (200-300 mg/jr pendant 7 jours) comme un traitement de référence pour tous les patients en choc septique ne répondant pas efficacement aux vasopresseurs [98]. Toutefois, l'étude internationale CORTICUS, conçue pour valider les résultats de Annane et al., n'a pas permis de retrouver une amélioration significative de la survie à 28 jours, même parmi les non-répondeurs à l'ACTH (définis par un delta cortisol  $< 9 \mu\text{g/dL}$ ); les auteurs observaient seulement une réversion plus rapide du choc chez les patients recevant l'hydrocortisone (50 mg iv / 6h pendant 5 jours puis à dose dégressive). La durée de séjour en soins intensifs et en hospitalisation était identique dans les deux groupes. De plus, on comptait davantage de surinfections dans le groupe de patients ayant reçus les corticoïdes [275].

Les résultats apparemment contradictoires de ces deux études [21, 275] peuvent être liés aux différences suivantes : 1) les patients inclus dans l'étude française [21] était plus grave comme semble montrer le taux de mortalité plus élevé dans le bras placebo (61% vs 31,5% pour CORTICUS), 2) le pourcentage de patients opérés différait également (40,1% vs 64,5% pour CORTICUS), 3) le délai d'administration de la corticothérapie était beaucoup plus court dans l'étude de Annane et al. (8h vs 72 h pour CORTICUS) et on peut penser que ce retard à l'administration des corticoïdes a pu être délétère, 4) enfin, contrairement aux patients de l'étude CORTICUS, ceux inclus dans l'étude de Annane et al. recevaient de la fludrocortisone. L'utilité de la fludrocortisone reste toutefois à démontrer dans cette situation, 5) enfin, les résultats négatifs de l'étude CORTICUS doivent être interprétés avec précaution car à peine 500 patients ont été inclus sur les 800 attendus. Le calcul post-hoc de la puissance de cette étude n'est que de 35%, si bien qu'elle ne peut prétendre à répondre à la question de l'utilité des corticoïdes dans le choc septique.

Faute de mieux, une récente méta-analyse réalisée par Annane et al. démontrait un bénéfice de la corticothérapie prolongée (> 7 jours) et à faible dose (< 300 mg/jr) au cours du sepsis sévère et du choc septique de l'adulte [18]. Le débat reste donc ouvert. En effet, contrairement à l'idée véhiculée par le concept d'insuffisance surrénale relative, Cohen et al. notaient, à partir de 14 études concernant des patients « critically ill », que les concentrations de cortisol total sérique chez les survivants étaient plus élevées que chez les non-survivants [87]. Une nouvelle terminologie “critical illness-related corticosteroid insufficiency (CIRCI)” était établi par une conférence de consensus supposant une situation de déficit en cortisol au niveau cellulaire soit par un défaut de production, soit par une résistance tissulaire au corticoïde [187].

## **2.2) Maladie du foie et insuffisance surrénale**

### **2.2.1) Hépatite aiguë et insuffisance surrénale**

Les patients ayant une hépatite aiguë sévère (définie par un TP < 50%) partagent plusieurs caractéristiques hémodynamiques avec les patients en choc septique, à savoir, une élévation du débit cardiaque, une baisse des résistances vasculaires périphériques, une chute de la pression artérielle moyenne et une résistance aux amines vasopressives [60, 92, 106, 136]. L'hépatite aiguë sévère peut évoluer vers une forme fulminante, elle-même grevée d'une lourde mortalité (estimée à 80% dans les séries historiques) en l'absence de transplantation hépatique. Comme dans le sepsis, l'hépatite aiguë sévère s'accompagne d'une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-6) avec notamment une bonne corrélation entre les concentrations de CRP et d'IL-6 [149]. Peu d'études ont évalué la fonction surrénale au cours de l'hépatite aiguë, qu'elle survienne sur foie sain ou sur une hépatopathie chronique pré-existante.

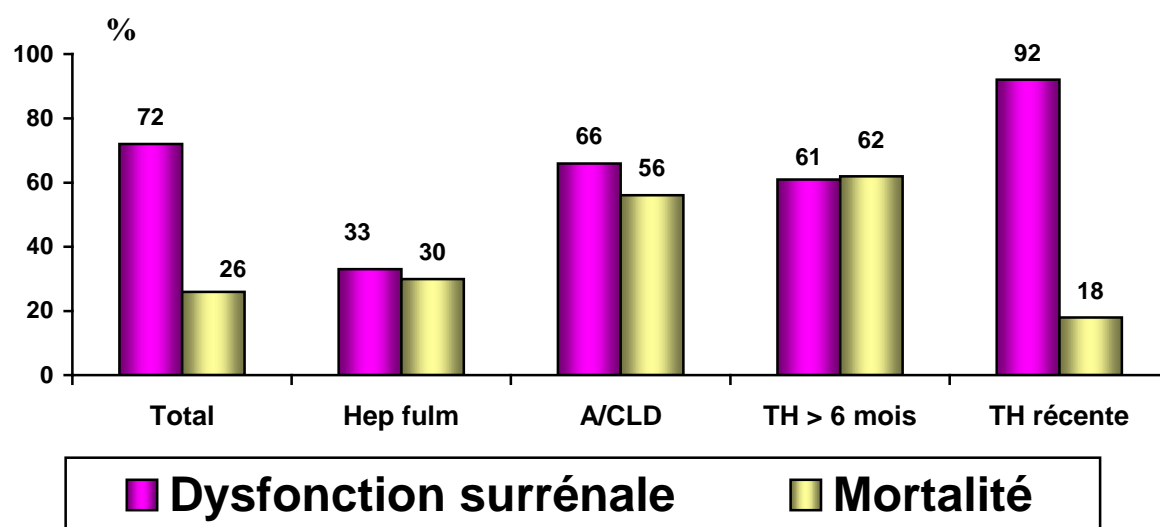
L'équipe du King's College Hospital a évalué la fonction surrénale par un test au Synacthène dosé à 250  $\mu$ g (test réalisé dans les 5 jours suivant l'admission) chez 45 patients ayant une insuffisance hépatique aiguë définie par une élévation de l'ALAT et, soit des troubles de la coagulation, soit une encéphalopathie [143]. La cause de l'atteinte hépatique

était médicamenteuse dans 84% des cas, dont 89% d'intoxication au paracétamol. La fonction surrénale était considérée comme anormale si la cortisolémie basale était < 250 nmol/L, si le pic de cortisolémie après Synacthène était < 500 nmol/L et/ou si le delta cortisol était < 250 nmol/L. Globalement, 62% des patients avaient au moins une de ces anomalies. Les patients en instabilité hémodynamique (TA moyenne < 60 mmHg ou nécessité d'un vasopresseur) avaient un pic de cortisol plus faible (436 vs 892 nmol/L) et un delta cortisol également plus faible (196 vs 566 nmol/L) comparés aux patients en hémodynamiquement stables. Les conclusions de ces auteurs étaient que l'insuffisance surrénale était fréquente au cours des hépatites aiguës sévères et était associée à une instabilité hémodynamique et à une surmortalité ; en effet, les malades décédés avaient un delta cortisol (148 vs 417 nmol/L ;  $p < 0,002$ ) et un pic de cortisol post-Synacthène (535 vs 768 nmol/L;  $p < 0,001$ ) plus bas que les survivants.

Ces mêmes auteurs ont analysé rétrospectivement l'effet de l'administration d'hydrocortisone (300 mg/jr pendant 8 jours en moyenne) sur les besoins en norépinéphrine et sur l'évolution de 20 patients ayant une insuffisance hépatique aiguë traités par des vasopresseurs [144]. Ces 20 patients étaient comparés à un groupe contrôle de 20 patients n'ayant pas reçu d'hydrocortisone, et appariés sur l'âge, le sexe, la gravité de la maladie (score SOFA) et la proportion d'atteinte hépatique aiguë sur foie sain ou sur une hépatopathie chronique pré-existante. La survie des patients dans les deux groupes était similaire malgré une durée de séjour en unité de soins intensifs plus longue dans le groupe « hydrocortisone ». Les besoins en norépinéphrine étaient initialement significativement plus faibles chez les patients recevant l'hydrocortisone au prix d'une augmentation de l'incidence des infections fongiques et des infections par des bactéries résistantes. Toutefois, ce profil de résistance bactérienne pouvait être lié à un séjour plus long en soins intensifs. Un test au Synacthène à 250 µg était réalisé avant la mise sous hydrocortisone et la normalité de la fonction surrénale était jugée sur une cortisolémie basale > 250 nmol/L, un pic de cortisolémie après Synacthène > 500 nmol/L et un delta cortisol > 250 nmol/L. Selon ces critères, 28%, 44% et 69% des patients ne répondaient pas respectivement à ces critères et pouvaient être considérés comme insuffisants surrénaliens. Toutefois, ces résultats « anormaux » ne permettaient pas de discriminer les patients pouvant ou non se dispenser d'un traitement vasopresseur.

Marik et al. ont rapporté l'évolution d'une cohorte de 340 patients hospitalisés ayant une maladie du foie (transplantation hépatique 50% ; hépatite fulminante 7% ; hépatopathie chronique 43%) [186]. Tous ces patients ont eu une évaluation de leur fonction surrénale avec un test au Synacthène dosé à 1 µg. La définition de la dysfonction surrénale était la suivante : 1) une cortisolémie basale < 552 nmol/L (20 µg/dL) chez les patients subissant un stress jugé important (« highly stressed »), c'est-à-dire une hypoxémie, une

hypotension artérielle systolique < 90 mmHg, un traitement vasopresseur; 2) une cortisolémie basale < 414 nmol/L (15 µg/dL) chez les patients subissant un stress jugé moins important (« non-highly stressed ») ou 3) un pic de cortisolémie après Synacthène < 552 nmol/L. En utilisant ces critères, l'incidence de la dysfonction surrénale était de 66% dans le groupe « hépatopathie chronique », de 33% dans le groupe « hépatite fulminante » et 61% chez les transplantés du foie depuis plus de 6 mois. De façon étonnante, l'incidence de la dysfonction surrénale était de 92% dans le groupe de patients transplantés depuis moins de 6 mois et ne recevant pas de corticoïdes (**Figure XI**).



**Figure XI** : Prévalence de la dysfonction surrénale et taux de mortalité chez des patients ayant une hépatite fulminante, une hépatite aiguë sur une maladie chronique du foie (A/CLD), une transplantation hépatique (TH) récente ou depuis plus de 6 mois.

La seule variable prédictive d'une dysfonction surrénale en analyse univariée était une concentration basse du HDL cholestérol chez les patients avec dysfonction surrénale ( $8,2 \pm 7,6$  mg/dL vs  $28,4 \pm 14,4$  mg/dL ;  $P < 0,0001$ ). La fonction hépatique (INR, albumine et bilirubine) et la créatininémie ne permettaient pas de différencier les groupes avec et sans dysfonction surrénale. Parmi les 119 transplantations récentes, 109 (92%) avaient une dysfonction surrénale : 51 patients (43%) retrouvaient rapidement une fonction hépatique normale en même temps qu'une normalisation du HDL cholestérol et du cortisol total sérique tandis que les 68 autres patients recevaient un traitement par hydrocortisone. Il faut noter que le diagnostic d'insuffisance surrénale est rarement fait en post-transplantation immédiate car la majorité des patients reçoivent une corticothérapie ; cependant, la conjonction d'un stress important et d'une prise médicamenteuse accélérant le métabolisme du cortisol



(anticonvulsivant par exemple) peut induire une insuffisance surrénale aiguë dans ce contexte de post-transplantation [270]. Constatant l'incidence élevée de la dysfonction surrénale dans leurs populations de patients ayant une maladie du foie, Marik et al. ont proposé le terme de « syndrome hépato-surrénalien » (« hepatoadrenal syndrome »), venant ainsi compléter des associations morbides plus connues, comme le syndrome hépato-rénal, le syndrome hépatopulmonaire ou l'hypertension porto-pulmonaire. Le **tableau VI** ci-dessous résume les résultats des études ayant évalué la fonction surrénale en cas d'hépatite aiguë.

Auteurs	N patients / type d'atteinte hépatique	Définition de l'IS	IS (%)	IS associée à :
Harry 2002	45 / IHA	[C] basal < 250 nM	38%	Instabilité hémodynamique
		Pic [C] < 500 nM	37%	Mortalité
		Delta [C] < 250 nM	39%	Besoin de transplantation
		Un de ces 3 critères	62%	
Harry 2003	20 / IHA et IHA sur MCF	[C] basal < 250 nM	28%	Tous traités par corticoïdes.
		Pic [C] < 500 nM	44%	Pas de différence de
		Delta [C] < 250 nM	69%	mortalité avec un groupe
		Un de ces 3 critères	69%	contrôle
Marik 2005	340 / IHA et IHA sur MCF (population hétérogène)	<u>Test à 1 µg :</u>	<u>IHA :</u>	Instabilité hémodynamique
		<u>Si « highly stressed » :</u>	33%	Mortalité
		[C] basal < 552 nM	<u>IHA/MCF :</u>	Survie augmentée avec les
		<u>Sinon :</u>	66%	corticoïdes
		[C] basal < 414 nM		
		Pic [C] < 500 nM		

**Tableau VI:** Etudes ayant évalué la fonction surrénale en cas d'hépatite aiguë. [C] : concentration sérique du cortisol total; IHA : insuffisance hépatique aiguë ; IS : insuffisance surrénale ; MCF : maladie chronique du foie.

Ces prévalences élevées d'insuffisance surrénale observée au cours des insuffisances hépatiques aiguës ne sont probablement pas tout à fait justes compte tenu du dosage de cortisol total utilisé, comme cela a déjà été discuté plus haut et sera discuté in extenso dans le commentaire de **l'article 6** de la présente thèse [288]. Du reste, une étude récente a montré que les taux de cortisol total sérique avant et après Synacthène® chez des patients non cirrhotiques en situation de stress étaient plus bas en cas d'albuminémie < 25 g/L que chez ceux ayant une albuminémie > 25 g/L (p<0,001); cependant, les taux sériques de cortisol libre sérique étaient similaires dans les deux groupes de patients hypo- et normo-albuminémique [142].

Ainsi, nous pensons que le dépistage de l'insuffisance surrénale par le dosage du cortisol total sérique chez les patients ayant une insuffisance hépatique aiguë sévère n'est pas fiable. L'élévation des cytokines pro-inflammatoires (notamment l'IL-6) pourrait contribuer à la baisse des concentrations du cortisol total sérique par le biais d'une chute des concentrations sériques de la CBG. Il a été montré que l'IL-6 inhibait la synthèse de la CBG dans des lignées de cellules HepG 6 [96] et les concentrations sériques les plus basses de CBG étaient retrouvées dans les 48 premières heures chez des patients en situation de stress [129]. Comme précédemment indiqué, près de 90% du cortisol sérique est lié (forme inactive) à la CBG et à l'albumine dont les taux sériques sont généralement rapidement abaissés dans les situations de stress [38] altérant ainsi l'interprétation des résultats du dosage du cortisol total sérique. Seule la fraction libre du cortisol (5-10% du cortisol total) mérite d'être dosée chez ces patients pour éviter de porter faussement un diagnostic d'insuffisance surrénale. Toutefois, le dosage par ultrafiltration du cortisol libre sérique (méthode de référence) n'est actuellement pas réalisable en routine du fait de sa complexité. Nous avons prévu d'explorer la fonction surrénale chez les patients ayant une atteinte hépatique aiguë. Pour ce faire, nous avons obtenu un financement par le PHRC interrégional 2011. Cette étude pilote prospective multicentrique (Besançon, Beaujon, Paul Brousse, Lyon) comparera les concentrations de cortisol total sérique, de cortisol libre sérique et de cortisol salivaire mesurées chez des patients ayant une hépatite aiguë sévère et non sévère, et chez des patients « contrôles » volontaires sains. Nous espérons inclure 111 sujets dans cette étude. Dix patients ayant une insuffisance surrénale bien documentée et suivi dans le service d'Endocrinologie de Besançon auront également un test au Synacthène pour comparer les concentrations du cortisol libre (basses chez les patients ayant une insuffisance surrénale) avec celles des patients ayant une hépatite aiguë. De plus, pour vérifier le caractère fonctionnel et réversible de l'insuffisance surrénale mise en évidence chez ces patients, nous contrôlerons la fonction surrénale quatre à six mois plus tard, lorsque la fonction hépatique se sera normalisée.

## **2.2.2) Cirrhose et insuffisance surrénale**

### **2.2.2.1) Physiopathologie de l'insuffisance surrénale au cours de la cirrhose**

Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la survenue d'une insuffisance surrénale au cours de la cirrhose sont mal compris. On évoque classiquement :

1) Des atteintes organiques de la glande surrénale liées à des phénomènes hémorragiques ou ischémiques en rapport avec les troubles de la coagulation [92]. En effet, il existe une baisse de la production des facteurs de la coagulation par le foie malade entraînant un risque hémorragique. Les anomalies de l'hémostase rencontrées chez ces patients ne sont pas uniquement la conséquence d'un défaut de synthèse des protéines pro-coagulantes par le foie puisque sont aussi présentes une thrombopénie, une CIVD chronique, une fibrinolyse accélérée, et une dysfibrinogénémie [230]. Le défaut de synthèse de protéines anticoagulantes peut aussi expliquer la survenue de thromboses. En dehors de la thrombose de la veine porte, qui est fréquente, la prévalence des thromboses veineuses reste toutefois rare, comprise entre 3% et 13,8% [216, 221]. Malgré ce contexte, l'atteinte des surrénales reste discutée. L'analyse autopsique des surrénales de 8 patients décédés d'une insuffisance hépatique aiguë et suspects d'avoir une insuffisance surrénale n'était pas démonstrative [143] ; la glande surrénale était considérée comme normale dans 6 cas ; un patient avait des suffusions hémorragiques intra-glandulaires et le dernier patient avait une atrophie glandulaire secondaire à une prise de corticoïdes. Il ne semblait donc pas y avoir une relation claire entre le diagnostic supposé d'insuffisance surrénale et les anomalies macroscopiques constatées en post-mortem.

2) Les patients cirrhotiques les plus sévères ont des caractéristiques hémodynamiques proches de celles rencontrées au cours du choc septique, associant une augmentation du débit cardiaque, une baisse des résistances vasculaires périphériques et une réponse vasculaire moindre aux vasopresseurs [60, 92, 106, 136]. Cette atteinte hémodynamique est clairement associée à une surproduction de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ) [11, 325] et à la surmortalité du patient cirrhotique [136, 176]. Ces cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ), élevées dans la cirrhose, sont d'importants modulateurs de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien [82, 190, 207]. Durant les processus inflammatoires, ces cytokines peuvent stimuler et maintenir une production élevée en glucocorticoïde [82, 190, 226, 300, 301]. Des récepteurs à l'IL-6 sont présents sur les cellules corticotropes de l'hypophyse et du cortex surrénalien [226, 300]. Lorsque la production cytokinique devient importante et prolongée, les récepteurs aux glucocorticoïdes deviennent moins nombreux et leur affinité baisse conduisant ainsi à une résistance tissulaire malgré des concentrations sériques élevées en cortisol [199]. La résistance tissulaire aux glucocorticoïdes est toutefois une hypothèse difficile à prouver car il faudrait être en mesure de pouvoir évaluer l'activité du cortisol au niveau cellulaire. Or, l'activité du cortisol au niveau cellulaire va dépendre de plusieurs paramètres mal étudiés jusqu'à ce jour, à savoir: la concentration du cortisol libre sérique, l'activité de la 11- $\beta$ -HSD, la concentration en récepteurs aux glucocorticoïdes et leurs affinité de liaison avec le cortisol,

et la translocation dans le noyau des récepteurs aux glucocorticoïdes [23]. Le sepsis accompagné d'un excès de concentrations sériques d'endotoxines peut conduire à l'instabilité hémodynamique [11, 325] et pourrait aussi être à l'origine d'une insuffisance surrénale, par des phénomènes de bas débit. Le TNF- $\alpha$  peut aussi supprimer la synthèse de cortisol, en orientant plutôt la stéroïdogénèse vers la production d'androgènes, conduisant ainsi à un épuisement surrénalien en cortisol [150].

3) Le précurseur majoritaire (80%) du cortisol est le cholestérol circulant, présent essentiellement dans les lipoprotéines plasmatiques (LDL surtout). Le cholestérol pénètre dans la cellule par les récepteurs aux LDL, passe dans les lysosomes, est libéré dans le cytoplasme grâce à la cholestérol estérase. Il pénètre ensuite dans la mitochondrie grâce à la protéine StAR qui est exprimée dans la surrénale, les ovaires, les testicules et les reins. La production du cortisol peut également se faire localement (20% des cas) à partir de l'acétyl CoA [53]. Comme ces hormones ne sont pas stockées dans la surrénale, tout besoin aigu nécessite la mise en jeu rapide de toutes les réactions enzymatiques.

Le HDL-cholestérol représente la part la plus importante de la stéroïdogénèse [330]. Un récepteur de haute affinité (Cla-1) pour le HDL-cholestérol est exprimé au niveau du foie et des surrénales [7]. Les faibles concentrations d'apolipoprotéine A-I/HDL chez les patients gravement malades pourrait rendre compte de l'incidence élevée de dysfonction surrénale retrouvée chez ces patients ; en effet, il a été démontré que de faibles concentrations de HDL cholestérol étaient associés à une réponse diminuée après injection de Synacthène [304]. On sait aussi que les concentrations sériques de HDL-cholestérol diminuent avec la gravité de la cirrhose [84]. D'autres auteurs ont observé que de faibles concentrations en HDL-cholestérol étaient prédictifs de dysfonction surrénale par épuisement du substrat « HDL-cholestérol » [185, 186, 304], mais des études récentes n'ont pas confirmé ces données ([281] et données personnelles). Pour Fede et al. [115] le cholestérol total et le LDL-cholestérol étaient associés à la dysfonction surrénale mais pas le HDL-cholestérol. Il serait nécessaire de vérifier, une fois qu'on aura établi les normes du cortisol libre sérique et défini un seuil valide pour le diagnostic d'insuffisance surrénale, si les concentrations de cholestérol sont réellement différentes en fonction de ce seuil du cortisol libre.

## **2.2.2.2) Prévalence de l'insuffisance surrénale au cours de la cirrhose**

Ces dernières années, une littérature émergente semble indiquer qu'il existe une prévalence élevée d'insuffisance surrénale au cours de la cirrhose, en période de stress ou chez des sujets hémodynamiquement stables, suggérant ainsi que l'insuffisance surrénale serait une condition latente de la cirrhose. Cependant, comme nous l'avons évoqué plus haut, les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'insuffisance surrénale au cours de la cirrhose n'ont toujours pas été clairement définis et cette association reste pour l'heure largement débattue.

L'interrogation de la banque de données bibliographiques produite par la National Library of Medicine (Medline) a été faite en avril 2011 en utilisant les mots-clés suivants: « cirrhosis », « liver failure », « sepsis », « septic shock », « cortisol », « corticosteroids », « adrenal insufficiency », « adrenal failure », et « synacthen ». L'analyse de cette base de données électroniques a permis d'identifier neuf articles rapportant des patients cirrhotiques ayant fait l'objet d'une évaluation de leur fonction surrénale [25, 115, 117, 124, 192, 281, 288, 295, 298]. Une dixième étude, commentée dans cette thèse (**article 6** au chapitre 3.6), est soumise à la publication.

Six études ont été réalisées chez des patients cirrhotiques jugés stables hémodynamiquement et évalués soit avec un test au Synacthène standard à 250 µg [124, 192, 281, 288] soit avec un test à 1 µg [115]. Une étude émanant de la cohorte de patients de l'étude CORTICIR (**article 6** de la présente thèse) a également évaluée la fonction surrénale avec le test à 1 µg chez des cirrhotiques non septiques. Les prévalences de dysfonction surrénale sont inscrites dans le **Tableau VII**.

Cinq études ont également été réalisées chez des patients cirrhotiques « stressés » [25, 117, 288, 295, 298], c'est-à-dire atteints de sepsis, de sepsis sévère ou de choc septique, conformément aux définitions habituelles [1]. La fonction surrénale était évaluée dans ces cas uniquement avec le test au Synacthène à 250 µg et les prévalences de dysfonction surrénale sont inscrites dans le **Tableau VIII**.

**Tableau VII:** Etudes prospectives ayant évalué la fonction surrénale chez des patients cirrhotiques stables en utilisant le test à 1 µg ou le test à 250 µg.

Auteurs (ref)	N patients (Child-Pugh)	Etiologie de la cirrhose	Meld (Md et IQR or My±DS)	% hommes / âge moyen (ans)	Technique	Delta CT < 250 nM (%)	Seuils pour dépister la dysfonction surrénale	Dysfonction surrénale (%)
McDonald et al.	38 non alcooliques (5A/18B/15C)	CBP (n=14) Virus (n=9) Autres (n=15)	46±1,7	58% / 46	RIA standard	Aucun seuil	27 cirrhotiques testés: pic et delta CT bas par rapport à 5 sujets contrôles	ND
*Fede et al.	101 (29A/38B/34C)	Virus 47% Alcool 25%	Md : 8 (6-10)	60% / 59	RIA standard	60%	T <sub>20</sub> ou T <sub>30</sub> CT < 500 nM	38%
Galbois et al.	88 (4A/24B/60C) 27.3% infectés	Alcool 72%	16±8	73% / 54	ECL	21,6%	T <sub>0</sub> CT < 250 nM ou T <sub>60</sub> CT < 500 nM ou Δ CT < 250 nM	33%
Tan et al.	43 (22A or B /21C)	Alcool 23% Virus 23% Alcool + virus 19%	13 (écart: 6-27)	74% / 51	LC-MS/MS	-	T <sub>60</sub> CT < 500 nM (n=18) ou Δ CT < 250 nM (n=20) ou T <sub>60</sub> CLS < 33 nM (n=5)	58%
*Thevenot et al.	95 (34A/29B/32C)	Alcool 84%	16,1±7.4	68% / 58	ECL	48,4%	T <sub>30</sub> CT < 510 nM	29,5% (16 Child C, 12 A/B)
Thevenot et al.	95 (34A/29B/32C)	Alcool 84%	16,1±7.4	68% / 58	ECL	9,5% (1 B, 8 C)	T <sub>60</sub> CT < 510 nM	6,3% (6 Child C)

CLS: cortisol libre sérique ; Md: médiane; My: Moyenne; ND: non déterminé; DS: déviation standard; CT: cortisol total; Δ : Delta, ECL: technique d'électrochemiluminescence; LC-MS/MS: chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse; RIA: test radioimmunologique;

\* : études ayant utilisées le test à 1 µg. Les valeurs du cortisol sont exprimées en nmol/L (1 µg/dL = 27.6 nmol/L).

**Tableau VIII** : Etudes prospectives ayant évalué la fonction surrénale chez des patients septiques cirrhotiques avec le test à 250 µg

Auteurs (ref)	Patients (n)	Cause de la cirrhose	Meld (My±DS) / SOFA	Homme (%) / âge (ans)	Δ cortisol total < 250 nM (%)	Seuils définissant la dysfonction surrénale	dysfonction surrénale (%)
Fernandez et al. 2006	25 chocs septiques	Alcool 76%	26,7±7,9 / 12,4±3	ND / 57	48%	T <sub>0</sub> CT < 414 nM ou Δ CT < 250 nM avec T <sub>0</sub> CT < 966 nM	68% (94% Child C)
Tsai et al. 2006	101 sepsis sévères	Virus 68% Alcool 38%	13±6 / 10,1±4,7	76% / 57	38,6%	T <sub>0</sub> CT < 414 nM ou Δ CT < 250 nM avec 414 < T <sub>0</sub> CT < 938 nM	51,4% (86% Child C)
Thierry et al. 2007	14 chocs septiques	Alcool 100%	25,4±13 / 13,6±3	50% / 64	ND	T <sub>0</sub> CT < 414 nM ou Δ CT < 250 nM	77%
Arabi et al. 2010	75 chocs septiques	Virus 75% Alcool 25%	ND / 14,4±3,7	56% / 60	76%	Δ CT < 250 nM	76%
Thevenot et al. 2011	30 sepsis	Alcool 87%	23,8±8 / ND	70% / 57	10%	T <sub>60</sub> CT < 510 nM	10% (100% Child C)

CT: cortisol total; DS: déviation standard; Md: médiane; My: Moyenne; ND: non déterminé; Δ: Delta, ECL: technique d'électrochemiluminescence ; LC-MS/MS: chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse; RIA: test radioimmunologique. Toutes ces études ont utilisé le test à 250 µg. Les valeurs du cortisol sont exprimées en nmol/L (1 µg/dL = 27.6 nmol/L).

### **2.2.2.3) Patients cirrhotiques stables évalué avec le test à 250 µg**

La première étude à s'être intéressée de près à la fonction surrénale chez le patient cirrhotique non alcoolique émane d'une équipe australienne [192]. Ces auteurs avaient souhaité éliminer l'effet propre de l'alcool sur l'axe HHS, résultant d'une inactivation de la 11-β-HSD de type 2 (décrit plus haut au *chapitre 2.10.2*) ; l'alcool est en effet un facteur confondant important et doit en effet être pris en compte dans l'analyse des résultats. L'excès de cortisol sérique lié à la consommation excessive d'alcool explique l'apparition d'un syndrome de pseudo cushing régressant à l'arrêt de la consommation d'alcool [160]. Inversement, l'alcool induit l'activité de l'isoenzyme 11β-HSD de type 1 qui réalise la fonction de réduction inverse transformant la cortisone en cortisol [9]. Les auteurs ont évalué la fonction surrénale chez 38 patients (22 hommes). Vingt-sept de ces patients ont eu un test au Synacthène à 250 µg (dosage du cortisol total sérique avant et 120 min après l'injection d'ACTH). Comparativement à 5 sujets sains contrôles, les patients cirrhotiques avaient une concentration basale de cortisol total similaire, mais un pic de cortisol et un delta cortisol abaissés respectivement de 26% et de 39%. Il était aussi observé des concentrations basses de CBG chez les sujets cirrhotiques avec des corrélations négatives entre le score de Child-Pugh et les concentrations de cortisol total avant ( $r = -0,43$  ;  $P=0,009$ ) et après Synacthène ( $r = -0,64$  ;  $P<0,0001$ ). Un autre facteur confondant révélé par cette étude était la baisse des concentrations de cortisol observée chez les patients recevant de la spironolactone, médicament largement prescrit au cours de la cirrhose et bloquant le cytochrome P450 lié à la stéroïdogénèse surrénalienne [262]. L'intérêt principal de cette étude a été de mettre en évidence une baisse des protéines porteuses du cortisol (principalement la CBG) corrélée à l'aggravation de la fonction hépatique, et expliquant la baisse du cortisol total sérique. Cette étude reste néanmoins critiquable. Le nombre de sujets testés par un test au Synacthène était faible ( $n=27$ ) et le moment de l'évaluation post-Synacthène (120 min après l'injection) n'était pas habituel. De plus cette étude laissait de côté la cause majoritaire des cirrhoses (l'alcool), alors que cette population aurait mérité une analyse spécifique au regard de sa forte prévalence et de ses particularités physiopathologiques.

L'équipe de la Pitié-Salpêtrière a évalué la fonction surrénale (test au Synacthène à 250 µg) chez 88 patients cirrhotiques admis en hospitalisation pour une complication de leur



cirrhose (57% d'hémorragie digestive, 13% d'encéphalopathie hépatique, 11% d'ascite, 7% d'insuffisance rénale et autres raisons dans 12% des cas) [124]. Les sepsis sévères et les chocs septiques étaient exclus et tous ces patients étaient considérés comme hémodynamiquement stables. Une infection était toutefois présente dans 27% des cas. Les méthodes de dosage du cortisol total sérique et salivaire et les seuils diagnostiques pour définir l'insuffisance surrénale sont résumés dans les **tableaux VII et IX**. La détermination du cortisol salivaire diminuait le pourcentage de faux positifs par rapport au cortisol total (9,1% avec le cortisol salivaire vs 33% en utilisant un critère composite avec le cortisol total à T<sub>0</sub>, à T<sub>60</sub> et le delta cortisol) si on considère que leurs patients n'avaient pas raisonnablement d'insuffisance surrénale (absence de symptômes suggestifs notamment). La concordance entre le cortisol total et le cortisol salivaire était faible ( $\kappa=0,28$ ) avec 22 patients suspects d'avoir une dysfonction surrénale avec le cortisol total mais un cortisol salivaire dans les valeurs normales de leur laboratoire. Pour tenter de comprendre cette discordance, les auteurs ont comparé les 65 patients sans discordance avec les 23 autres patients discordants : en analyse multivariée, seule l'hypoalbuminémie ( $\leq 25$  g/L) pouvait conduire à porter plus souvent un diagnostic d'insuffisance surrénale avec le dosage du cortisol total sérique (54% avec le cortisol total vs. 23% avec le cortisol salivaire ;  $P=0,006$ ). Les variables prédictives d'insuffisance surrénale avec le dosage du cortisol salivaire en analyse multivariée étaient l'ascite et une concentration sérique d'HDL-cholestérol faible. Les concentrations de cortisol libre sérique étaient estimées par la formule de Coolens et la corrélation entre cette estimation du cortisol libre et le cortisol salivaire à T<sub>0</sub> était jugée excellente (coefficient de Spearman :  $r = 0,91$ ) et moins bonne avec le cortisol total sérique ( $r = 0,76$ ). Cet article présente plusieurs avantages : 1) il s'agit d'une large cohorte de patients cirrhotiques « stables » évalués pour leur fonction surrénale ; 2) les auteurs évaluent pour la première fois la salivette Sarstedt comme moyen diagnostique d'insuffisance surrénale ; 3) ils confirment les données préliminaires de McDonald [192] sur le fait que la baisse de la CBG et/ou de l'albumine sérique conduit à surestimer la prévalence de l'insuffisance surrénale dans cette population (68% de Child C). Les patients ayant une albuminémie  $\leq 25$  g/L devraient ainsi bénéficier préférentiellement d'un test salivaire plutôt que d'un dosage du cortisol ; 4) les auteurs émettent des hypothèses sur le mécanisme de l'insuffisance surrénale qui ferait intervenir l'existence d'une ascite et d'un HDL-cholestérol faible. Cet article possède néanmoins des limites : 1) la prévalence de concentrations basses du cortisol salivaire ( $n=8/88$  patients), faisant porter un diagnostic d'insuffisance surrénale, était faible ; cette faible prévalence de l'insuffisance surrénale avec le cortisol salivaire rendait toute analyse multivariée délicate à interpréter ; 2) la population concernée était hétérogène, comprenant 27% de malades infectés chez lesquels la fonction surrénale pourrait être différente, même si l'infection était maîtrisée par l'antibiothérapie ; 3) les auteurs utilisent la

formule de Coolens comme diagnostic de référence pour valider l'intérêt du cortisol salivaire et n'ont pas pris la peine de mesurer le cortisol libre sérique. Cependant, plusieurs travaux **[35, 281, 316]** et *l'article 7* présenté dans cette thèse] soulignent les faiblesses de la formule de Coolens, qui ne peut donc être validée comme méthode de référence pour le diagnostic d'insuffisance surrénale dans cette population.

L'équipe australienne citée plus haut a évalué la fonction surrénale (test au Synacthène à 250 µg) chez 43 patients cirrhotiques compensés et 10 sujets sains en mesurant le cortisol total sérique et surtout, pour la première fois, le cortisol libre sérique **[281]**. Le cortisol libre sérique était mesuré par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse **[148]**. Les auteurs définissaient l'insuffisance surrénale selon différents critères résumés dans le **tableau VII** et le diagnostic d'insuffisance surrénale était retenu en présence d'un seul de ces critères. De façon attendue, les patients cirrhotiques avaient des concentrations sériques post-Synacthène de cortisol total et un delta du cortisol total significativement plus bas que les sujets sains, malgré des concentrations sériques du cortisol libre plus élevées à T0 ( $10,9 \pm 1,3$  vs  $6,4 \pm 1$  ;  $P = 0,03$ ). En utilisant le cortisol total, 58% (n=25) des patients cirrhotiques étaient dans les critères d'insuffisance surrénale alors que cette prévalence n'était plus que de 12% (n=5) avec le cortisol libre sérique ; ces 5 patients remplissaient également les critères d'insuffisance surrénale avec le cortisol total. Les 25 patients classés en insuffisance surrénale avaient un pic de cortisol libre significativement plus faible que les 18 autres patients mais il n'y avait pas de différence concernant la proportion d'ascite et le profil lipidique (HDL et LDL-cholestérol) entre ces deux groupes. Les 5 patients ayant un cortisol libre sérique bas ( $< 33$  nmol/L) avaient un score de MELD et un taux de mortalité plus élevé par rapport aux 38 autres patients (3/5 soit 60% vs 5% ;  $P=0,0007$ ). Ces résultats sont en contradiction avec ceux de notre série que nous détaillerons ultérieurement.

L'intérêt majeur de cet article est l'utilisation pour la première fois du dosage du cortisol libre sérique pour tenter de définir un diagnostic de dysfonction surrénale. Le seul problème est qu'il n'existe pas de seuil bien défini et les auteurs doivent s'appuyer sur des publications ayant inclus soit des sujets sains (écart : 33-138 nmol/L pour **[315]** et 33,7-168,5 nmol/L pour **[174]**) soit des sujets gravement malades (seuil à 52 nmol/L pour **[142]**). De plus la méthode de dosage du cortisol libre sérique n'est pas standardisée et diffère selon les études.

Les résultats de notre étude réalisée chez 95 patients cirrhotiques « stables » avec le test à 250 µg seront détaillés plus loin dans cette thèse **[288]**.

## **2.2.2.4) Patients cirrhotiques stables évalués avec le test à 1 µg**

Deux études ont été réalisées chez des patients cirrhotiques « stables » avec le test à 1 µg ; notre étude est en cours de soumission et sera détaillée plus loin dans cette thèse. L'étude italo-britannique de Fede et al. a évalué la fonction surrénale chez 101 patients cirrhotiques « stables » cliniquement [115]. En utilisant le pic de cortisol à 20 ou 30 min ( $< 497$  nmol/L,  $18$  µg/dL) après l'injection de Synacthène  $1$  µg [134, 142], 38% des patients avaient un diagnostic d'insuffisance surrénale. Les auteurs observaient une baisse des concentrations sériques du cortisol total parallèle à la gravité de l'insuffisance hépatocellulaire. En abaissant le seuil du cortisol total à  $16$  µg/dL ( $440$  nmol/L), comme récemment recommandé [157], 29% des patients avaient un diagnostic d'insuffisance surrénale. De plus, 60% des patients avaient un delta cortisol  $< 250$  nmol/L et donc étaient suspects d'avoir une insuffisance surrénale. Comparés aux 20 patients ayant des concentrations sériques d'albumine  $\geq 25$  g/L, les 81 patients ayant une albuminémie  $< 25$  g/L avaient un pic et un delta cortisol total plus faibles et un diagnostic d'insuffisance surrénale plus souvent suspecté (68,4% vs 32% ;  $P=0,02$ ). Pour estimer la valeur du cortisol libre sérique, les auteurs ont utilisé la formule de Coolens [90] dans un sous-groupe de 41 patients ; le pic et le delta du cortisol libre estimé par cette méthode étaient significativement plus faibles dans le groupe de patients ayant une suspicion d'insuffisance surrénale avec le cortisol total (pic  $< 497$  nmol/L) même si l'index de cortisol libre (ICL) de ces patients était toujours  $> 12$  (un ICL  $> 12$  est censé représenter une fonction surrénale normale [100]). Pour bien identifier les patients ayant une insuffisance surrénale avec le cortisol total (pic  $< 497$  nmol/L), des courbes ROC ont été construites avec les trois variables d'intérêt (cortisol total, Child-Pugh et MELD) mises en évidence par l'analyse multivariée en régression logistique. Un score de Child-Pugh  $\geq 7$  et un score de MELD  $\geq 12$  identifiaient au mieux ces patients.

L'intérêt majeur de cette étude est l'évaluation, pour la première fois, de la fonction surrénale par le test à  $1$  µg, renseignant ainsi sur les valeurs de cortisol total observées 20 à 30 minutes après l'injection du Synacthène. Il est surprenant de constater que plus d'un tiers des patients cliniquement stables avait un diagnostic d'insuffisance surrénale, accréditée (selon les auteurs) par une baisse des concentrations du cortisol libre estimé par la formule de Coolens. Les auteurs s'aventurent donc pour affirmer que la cirrhose est une condition propice au développement d'une insuffisance surrénale.

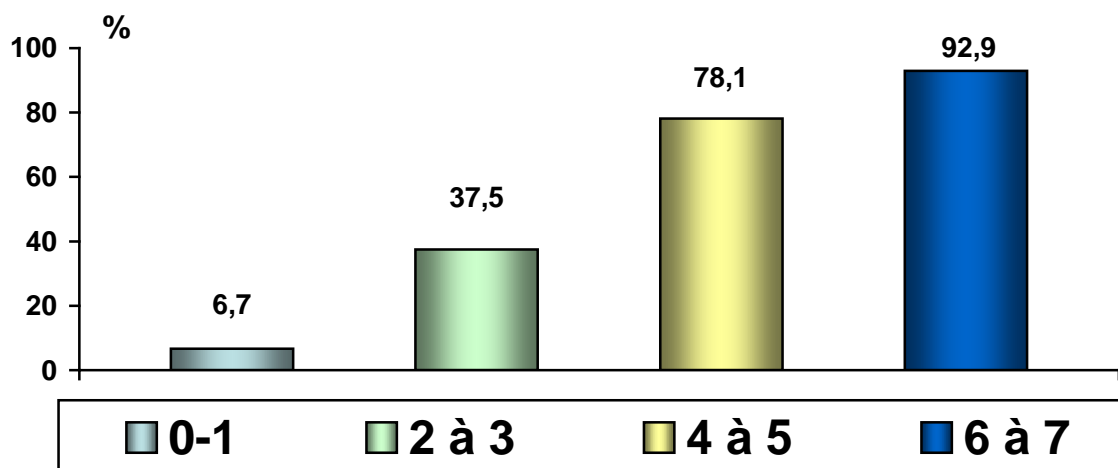
Cependant, la formule de Coolens n'a jamais été validée dans une population de patients cirrhotiques et présente comme inconvénient majeur de ne pas prendre en compte

la valeur de l'albumine. Les auteurs en ont déduit que la cirrhose est une condition propice au développement d'une insuffisance surrénale. Les auteurs de cet article ont consenti à signaler la nécessité de valider leurs résultats en mesurant le cortisol libre par une méthode de référence. De même, l'ICL ne fournit pas une mesure directe du cortisol libre et ne prend pas en compte la valeur de l'albuminémie. Des études ultérieures sont donc nécessaires pour valider cet indicateur chez les cirrhotiques.

### 2.2.2.5) Patients cirrhotiques en situation de stress évalués avec le test à 250 µg

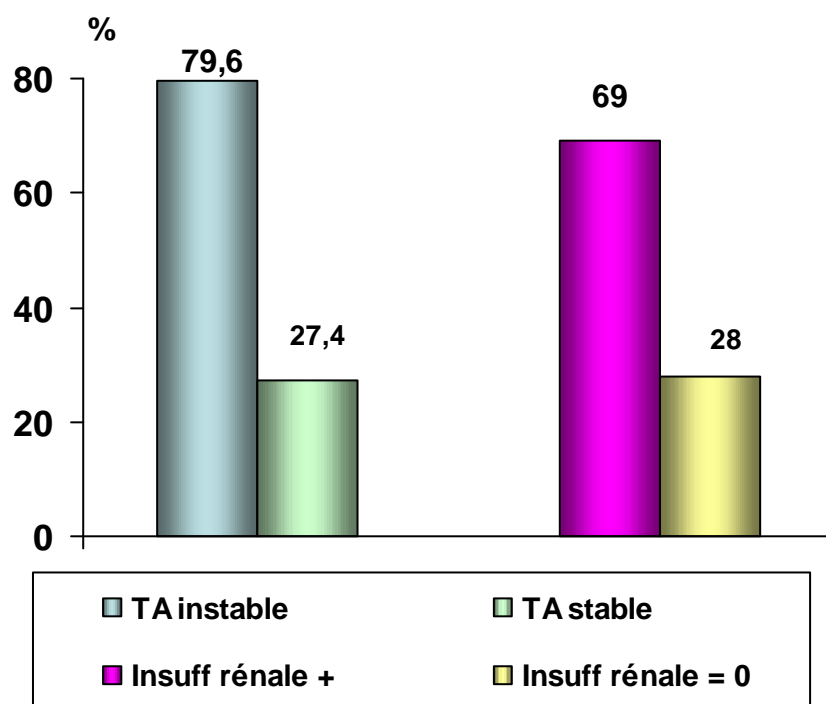
En 2006, paraissait dans la revue « Hepatology » et pratiquement avec le même titre deux articles évaluant la fonction surrénale chez des sujets cirrhotiques atteints de sepsis sévère ou de choc septique [117, 298]. Classiquement, le pronostic des patients cirrhotiques admis dans une unité de soins intensifs pour sepsis sévère ou choc septique est très mauvais, pouvant atteindre 90% de mortalité lors du séjour en réanimation [203, 232, 267].

1) Le premier article émane de l'équipe de Taiwan [298]. Les auteurs ont inclus 101 patients cirrhotiques consécutifs en sepsis sévères. La sévérité de la maladie était évaluée par différents scores (OSF, SOFA, MELD, APACHE III). En appliquant les seuils du cortisol total avant Synacthène ou du delta cortisol total (cf. **Tableau VIII**), les auteurs retrouvaient 52 patients (51.4%) suspects d'avoir une insuffisance surrénale. En analyse multivariée, la pression artérielle moyenne, le taux de bilirubine, la dépendance aux vasopresseurs et les bactériémies étaient prédictifs d'insuffisance surrénale. Le delta cortisol total était corrélé négativement avec les scores de Child-Pugh, de MELD, de SOFA et de l'APACHE III.



**Figure XII :** Prévalence de la dysfonction surrénale selon le nombre d'organes défaillants.

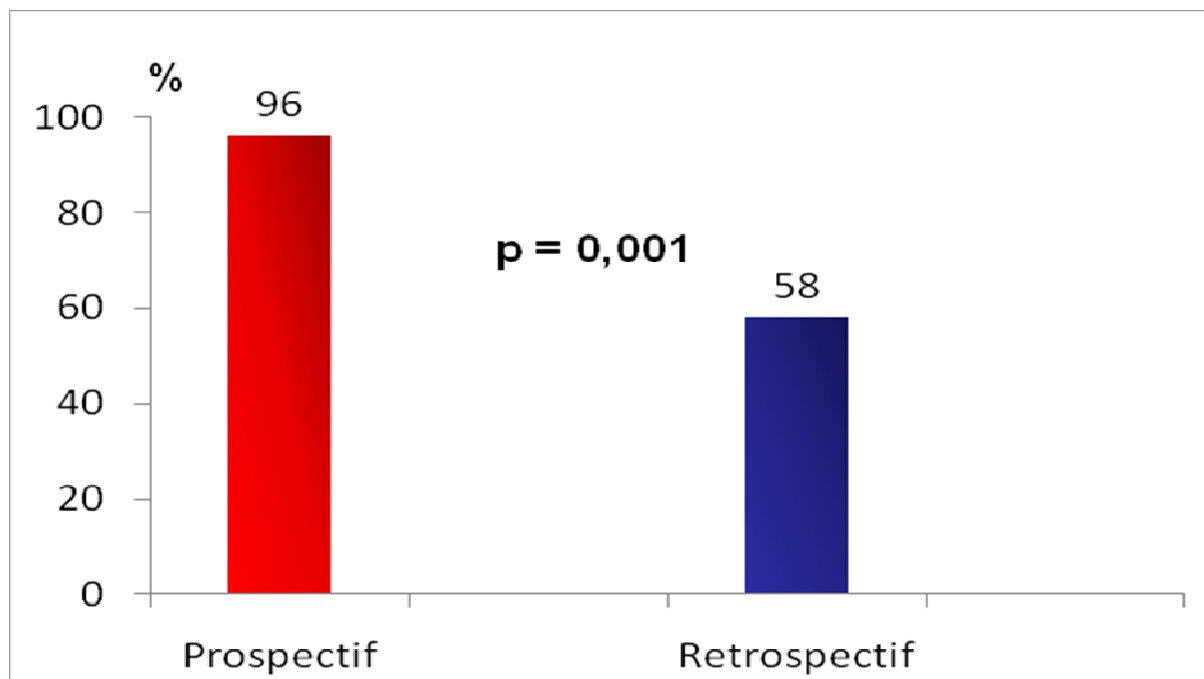
La corrélation négative ( $r = - 0,33$  ;  $P = 0,001$ ) entre le score de Child-Pugh et le delta cortisol total suggérait que l'insuffisance surrénale était liée à la fonction hépatique. L'incidence de la dysfonction surrénale augmentait avec le nombre d'organes défaillants, l'instabilité hémodynamique et l'insuffisance rénale constatée le jour du test au Synacthène (cf. **Figure XII**). Globalement, 59,4% des patients décédaient et la mortalité hospitalière était plus élevée dans le groupe de patients ayant une suspicion d'insuffisance surrénale (80,7% vs 36,7% en l'absence d'insuffisance surrénale). Les patients décédés avaient des taux de cortisol total avant Synacthène significativement plus élevés que les survivants, avec pour corollaire, un delta cortisol plus faible puisque le pic de cortisol était similaire entre les groupes « décédés » et « survivants ». En analyse multivariée, la réponse cortisolique au Synacthène et le score APACHE III prédisaient de façon indépendante la mortalité hospitalière.



**Figure XIII:** Prévalence de la dysfonction surrénale selon l'état hémodynamique et l'insuffisance rénale initiale.

Cette étude a relancé le débat concernant la place des corticoïdes au cours du sepsis sévère. Si la question semble être réglée chez les patients tout-venants, elle méritait d'être posée chez les patients cirrhotiques. Beaucoup d'arguments laissaient en effet penser qu'il existait une insuffisance surrénale latente chez ces patients, pouvant aggraver l'état hémodynamique [19] et favoriser la défaillance multiviscérale. Les corticoïdes pourraient par conséquent améliorer la réponse aux vasopresseurs et améliorer l'évolution des patients atteints d'insuffisance surrénale [21, 40]. Ces effets bénéfiques des corticoïdes pourraient être secondaires à une baisse de la production du monoxyde d'azote (NO) et des cytokines pro-inflammatoires [158], impliqués de façon majeure dans les altérations hémodynamiques du patient cirrhotique. Cette étude pose néanmoins beaucoup plus de questions qu'elle n'en résout : il s'agit d'une étude observationnelle sujette à un déséquilibre entre les groupes « décédés » et « survivants » liés à des facteurs de confusion connus ou inconnus ; on dispose de peu de renseignements concernant le degré d'hypertension portale, les traitements administrés, et surtout les concentrations de la principale protéine porteuse du cortisol (la CBG). Enfin, il n'y a pas eu de mesure du cortisol libre sérique.

L'équipe de Barcelone a également testée la fonction surrénale chez 25 patients cirrhotiques consécutifs en choc septique (groupe 1) [117]. Les critères diagnostiques d'insuffisance surrénale étaient presque identiques à ceux de l'étude de Tsai et al. Les patients suspects d'avoir une dysfonction surrénale recevaient 50 mg IV/6 h. d'hydrocortisone, avec une réduction graduelle des doses lorsque les patients étaient sevrés des vasopresseurs. Ces patients étaient comparés à un groupe historique de 50 patients cirrhotiques n'ayant pas eu d'évaluation de la fonction surrénale (groupe 2). Ces deux groupes de patients avaient une fonction hépatique (score de MELD et Child-Pugh) et une sévérité globale (score SOFA et APACHE II) peu différentes. L'incidence de l'insuffisance surrénale était de 68% (n=17) dans le groupe 1 et la résolution du choc septique était plus souvent observée dans ce groupe ayant reçu une corticothérapie par rapport au groupe historique (cf. figure XIII)



**Figure XIV:** Fréquence de la résolution du choc septique dans les groupes « prospectif » (ce groupe a reçu de l'hydrocortisone) et « rétrospectif ».

Les décès étaient moins nombreux dans le groupe 1 (32% vs 62% ;  $P=0,03$ ) et la principale cause de décès dans le groupe 2 était le choc réfractaire (20 / 31 décès dans le groupe 2 vs 0 / 8 décès dans le groupe 1 ;  $P=0,001$ ).

Bien que les auteurs nous indiquent que les deux groupes comparés étaient similaires au regard de l'insuffisance hépatique, un examen attentif des paramètres biologiques permet de constater que l'albuminémie était significativement plus faible dans le groupe 1 ( $23 \pm 5$  vs  $27 \pm 5$  dans le groupe 2 ;  $P < 0,05$ ). Bien qu'il n'y ait pas eu de dosage de la CBG (mais celle-ci est habituellement corrélée à l'albuminémie), il est vraisemblable que la prévalence de l'insuffisance surrénale ait été surestimée dans le groupe 1. Par ailleurs, la comparaison avec un groupe historique fait craindre l'absence de prise en compte de différents biais (Ex : amélioration de la prise en charge des malades avec le temps, exhaustivité du recrutement, etc.). La plus faible proportion de décès dans le groupe traité par hydrocortisone était quoi qu'il en soit un élément suffisamment marquant pour encourager la réalisation d'un essai randomisé susceptible de définir la place réelle des corticoïdes dans la prise en charge des cirrhotiques atteints de sepsis sévère ou de choc septique. Malheureusement, cet essai tant attendu n'a pu être mené à son terme par un défaut d'inclusion [275]. Il faut également souligner la présence de deux cas d'infections fongiques sous hydrocortisone responsables directement du décès. L'identification des malades pouvant bénéficier d'un traitement par l'hydrocortisone reste donc un défi d'envergure et nul doute qu'une discussion bénéfice-risque s'annoncerait difficile quand bien même la démonstration factuelle de l'intérêt de

l'hydrocortisone serait obtenue. Actuellement, le clinicien reste démuné : les signes cliniques d'insuffisance surrénale ne sont pas assez spécifiques pour l'orienter et les meilleurs outils paracliniques restent à valider.

Une équipe parisienne a évaluée la fonction surrénale chez 14 patients cirrhotiques (tous alcooliques) ayant un choc septique avec un test au Synacthène à 250 µg [295]. La dysfonction surrénale était suspectée lorsque la cortisolémie totale basale était < 15 µg/dL (414 nmol/L) et/ou le delta cortisol < 9 µg/dL (250 nmol/L). L'objectif principal de cette étude était de déterminer les caractéristiques de l'échographie cardiaque et l'évolution de ces patients comparativement à un groupe de 20 patients ayant un choc septique mais sans cirrhose. La gravité de la maladie évaluée par les scores de SOFA et SAPS II étaient similaires entre les deux groupes. Les taux de mortalité dans l'unité de soins intensifs ne différaient pas significativement entre les deux groupes (64% en cas de cirrhose vs 45% en l'absence de cirrhose ;  $P=0,27$ ). Les concentrations sériques de cortisol total avant et après Synacthène étaient peu différentes entre les deux groupes. Le diagnostic d'insuffisance surrénale chez les sujets cirrhotiques et non cirrhotiques était finalement porté chez 77% et 50% des cas respectivement. Cette étude a montré une plus grande prévalence de l'insuffisance surrénale chez les patients cirrhotiques en choc septique comparés aux sujets contrôles non cirrhotiques ; la différence de prévalence n'était toutefois pas significative peut-être en rapport avec les faibles effectifs de cette étude. Les auteurs observaient une corrélation négative entre le score MELD et les concentrations du cortisol à T0 ( $r=-0,64$ ) et à T60 ( $r=-0,68$ ). Cet article ne fait que renforcer l'idée que l'insuffisance surrénale dans le choc septique est fréquemment diagnostiquée lorsqu'on utilise le cortisol total sérique comme outil de dépistage. Le type de sédation des patients ventilés n'est pas indiqué dans cette étude; on ne sait pas notamment si l'étomidate a été utilisé (ce médicament diminue la production du cortisol).

Une étude randomisée en double aveugle contrôlé contre un placebo provenant de Riyadh [25] a évalué chez 75 patients cirrhotiques en choc septique l'intérêt de l'administration d'hydrocortisone sur la survie. Après randomisation, le médicament était administré dans les 24 heures à 50 mg/6h jusqu'à stabilité hémodynamique (pression artérielle moyenne > 65 mmHg sans vasopresseur pendant 24h) puis diminution progressive des doses sur 8 jours. Malgré une amélioration hémodynamique initiale, l'analyse intermédiaire révélait une surmortalité à 28 jours dans le bras « hydrocortisone » (85% vs 72% avec le placebo;  $P=0.19$ ) conduisant à l'interruption de l'essai. De plus, les auteurs observaient dans le bras « hydrocortisone » un risque augmenté de rechute de l'état de choc pendant et après la réduction de dose d'hydrocortisone (34% vs 14% dans le bras placebo ;



P=0,03) et trois fois plus d'hémorragie gastro-intestinale (33% vs 11% dans le bras placebo ; P=0,02). Comme dans les précédentes études concernant cette population, la prévalence d'insuffisance surrénale était élevée (76%). Les raisons d'un effet délétère aussi clair de la corticothérapie ne sont pas bien connues. Elles pourraient être liées à une baisse des défenses immunitaires et à une réponse inflammatoire diminuée favorisant un contrôle retardé de l'infection. Les autres éléments pouvant rendre compte (en partie) des résultats divergents entre les études sont le temps plus ou moins long écoulé jusqu'à l'administration de l'hydrocortisone ; dans l'étude de Annane et al., l'hydrocortisone était administré dans les 8 heures après la randomisation [21] alors qu'il était de 72 heures dans l'essai CORTICUS [275]. Les autres éléments qui pourraient déséquilibrer les groupes sont : 1) l'administration de médicaments pouvant interagir avec l'évolution du sepsis ; dans l'étude de Annane et al., la fludrocortisone était associée à l'hydrocortisone (analogue de l'aldostérone ayant un effet bénéfique probable sur la volémie en augmentant la réabsorption sodée et un effet sur le tonus vasculaire [108]), et 2) le moment opportun de la baisse des corticoïdes.

### 2.2.2.6) Dosage du cortisol salivaire dans la cirrhose

Deux équipes médicales ont testé le cortisol salivaire au cours de la cirrhose. L'étude de la Pitié-Salpêtrière a été discutée au *chapitre 3, section 3.2.3*, et les résultats figurent dans le **tableau IX** ci-dessous. Les résultats de notre équipe seront discutés au *chapitre 4* ; nous avons également inscrit nos résultats sur le cortisol salivaire dans le **tableau IX**.

En dehors de la cirrhose, une étude récente a évalué le cortisol salivaire et libre sérique chez 51 patients « critically ill », en fonction du taux d'albuminémie ( $\leq 25$  g/L or  $> 25$ g/L) [27]. Les auteurs observaient les mêmes résultats que dans ceux retrouvés au cours de la cirrhose, à savoir : 1) une bonne corrélation entre le cortisol salivaire et libre sérique, quelle que soit les taux d'albuminémie ; 2) des concentrations de cortisol total sérique plus faibles lorsque l'albuminémie était basse ( $< 25$  g/L), à gravité égale de la maladie, alors que ces deux groupes de patients avaient des concentrations de cortisol salivaire et libre sérique peu différentes [27].

**Tableau IX:** Etudes ayant évalué le cortisol salivaire chez des patients cirrhotiques.

Auteurs (ref)	Patients (n)	Cortisol salivaire à T <sub>0</sub> (nM)	Cortisol salivaire à T <sub>60</sub> (nM)	Méthode de dosage	Salive insuffisante	Seuils définissant la dysfonction surrénale (n: nombre de patients ayant le critère)	Dysfonction surrénale (%)
Galbois et al.	98 cirrhoses « stables »	425 (écart: 389-500)	817 (écart: 759-897)	Méthode RIA (coat-a-count kit) Salivette Sarstedt	10,2%	T <sub>0</sub> CS < 5 nM (n=6) or T <sub>60</sub> CS < 35 nM (n=3) or Δ CS < 8,3 nM (n=3)	9,1%
Thevenot et al.	95 « stables » 30 septiques	19,7±12,1 30,2±31,8	86,8±40,6 74,7±32,8	Méthode RIA (CORT-CT2 kit) Salivette Sarstedt	1% 13,3%	T <sub>0</sub> CS < 6,2 nM (n=10) T <sub>0</sub> CS < 6,2 nM (n=3)	10,5% 10%

Toutes ces études ont utilisé le test à 250 µg. Les valeurs du cortisol sont exprimées en nmol/L (1 µg/dL = 27.6 nmol/L). Δ: Delta ; CS: cortisol salivaire ; RIA: test radioimmunologique.

**Tableau X:** Etudes ayant évalué le cortisol libre sérique chez des patients cirrhotiques.

Auteurs (ref)	Population / test à 250 ou 1 µg	Méthode de dosage	Cortisol libre sérique à T <sub>0</sub> (nM)	Cortisol libre sérique à T <sub>30</sub> et/ou T <sub>60</sub> (nM)	Seuils définissant la dysfonction surrénale	Dysfonction surrénale (%)
Tan et al.	43 cirrhoses stables 10 sujets sains contrôles / 250 µg SST	LC-MS/MS	10,9±1,3 6,4±1 (P=0,03)	55±3,2 58±4,6 (P=NS)	<sup>\$</sup> T <sub>30-60</sub> CLS < 33 nM (n=5*) sujets sains	12% 0%
Thevenot et al.	95 stables 30 septiques / 250 µg	Ultrafiltration centrifugale et RIA	48,8±36,0 75,3±43,4	144,7±59,0 183,7±87,5	T <sub>60</sub> CLS < 12,4 nM <sup>£</sup> (n=3) Pas de seuil pour les septiques	3,2% ND
Thevenot et al.	95 cirrhoses stables / 1 µg	Ultrafiltration centrifugale et RIA	47,6±32,4	102,7±52,7	T <sub>30</sub> CLS < 12,4 nM <sup>£</sup> (n=3)	3,2%

£: Le seuil inférieur du cortisol libre sérique des patients non septiques était de 12,4 nmol/L pour notre laboratoire. Le seuil inférieur du cortisol libre sérique pour les patients septiques n'était pas déterminé. Le cortisol libre sérique était mesuré par ultrafiltration centrifugale puis, le cortisol contenu dans la fraction filtrée était mesuré par RIA. Seulement 3 patients avaient un CLS < 12,4 nM avec le test à 250 µg et à 1 µg mais un seul patient avait une suspicion de dysfonction surrénale en utilisant les deux tests.

\$ Dans cette étude, le pic de cortisol était mesuré à 30 et à 60 min après l'injection de 250 µg ACTH. \* ces 5 patients avaient aussi un cortisol total à T<sub>60</sub> < 500 nM (critère standard) et 4 avaient un delta cortisol total < 250 nM (critère CIRCI).

CLS: cortisol libre sérique. LC-MS/MS: chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. ND: non déterminé. RIA: test radioimmunologique.

# **Chapitre 3 :**

# **CONTRIBUTION**

# **PERSONNELLE**

### **3.1) Article 1**

De Gottardi A, **Thevenot T**, Spahr L, Morard I, Bresson-Hadni S, Torres F, Giostra E, Hadengue A.

Risk of complications after abdominal paracentesis  
in cirrhotic patients: a prospective study

*Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:906-9

## BRIEF COMMUNICATION

### Risk of Complications After Abdominal Paracentesis in Cirrhotic Patients: A Prospective Study

ANDREA DE GOTTARDI,\* THIERRY THÉVENOT,† LAURENT SPAHR,\* ISABELLE MORARD,\*  
SOLANGE BRESSON-HADNI,‡ FERRAN TORRES,§ EMILIANO GIOSTRA,\* and ANTOINE HADENGUE\*

\*Division of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital of Geneva, Geneva, Switzerland; †Division of Hepatology, Hôpital Jean Minjoz, Besançon, France; and ‡Laboratory of Biostatistics and Epidemiology (Universitat Autònoma de Barcelona) and Clinical Pharmacology (Hospital Clínic), Barcelona, Spain

**BACKGROUND & AIMS:** Complications and technical problems of paracentesis in cirrhotic patients are infrequent. However, the severity and the incidence of these events and their risk factors have not been assessed prospectively. **METHODS:** Cirrhotic patients ( $n = 171$ ) undergoing paracentesis were included. Of the 515 paracenteses, 8.8% were diagnostic, and 91.2% were therapeutic. Technical features, demographic data, and adverse events during a period of 72 hours after the procedure were examined. **RESULTS:** Major complications occurred in 1.6% of procedures and included 5 bleedings and 3 infections, resulting in death in 2 cases. Major complications were associated with therapeutic but not diagnostic procedures and tended to be more prevalent in patients with low platelet count ( $<50 \times 10^9/L$ ), Child-Pugh stage C, and in alcoholic cirrhosis patients. Technical problems occurred in 5.6%. The most frequent complication was a leak of ascites at the puncture site (5.0%), and in 89.5% there were no complications. **CONCLUSIONS:** The safety of paracentesis in cirrhotic patients might be decreased if risk factors, which depend on the characteristics of the patient and of the procedure itself, are present.

Ascites in cirrhotic patients is associated with a poor long-term outcome and an increased risk of developing spontaneous bacterial peritonitis and renal failure.<sup>1</sup> Paracentesis allows the analysis of ascitic fluid to rule out spontaneous bacterial peritonitis and the identification of other possible causes of ascites according to the serum-ascites albumin gradient.<sup>2</sup> In addition, when ascites is abundant enough to cause marked discomfort, large-volume paracentesis represents the treatment of choice; it is preferred to diuretics or, at least initially, to transjugular or surgical portosystemic shunts.<sup>3-6</sup>

Severe short-term complications related to paracentesis, such as bleeding or intestinal perforation, are exceedingly rare if the procedure is performed with an appropriate technique.<sup>7-9</sup> However, risks and incidence of complications of any gravity and technical problems of paracentesis have been poorly documented. Most data published so far have been collected and analyzed retrospectively or presented as case reports,<sup>10-14</sup> with most studies focusing only on hemorrhagic complications after paracentesis.<sup>13-16</sup>

The aim of the present study was to investigate technical problems during the procedure, to scrutinize local complications with varying degrees of severity occurring after paracentesis, and to identify pre-procedure risk factors associated with complications in patients with chronic liver disease.

#### Patients and Methods

Patients aged 18 years or older needing a paracentesis were included in this prospective study.

Diagnosis of cirrhosis was documented by using previous liver biopsy findings or on the basis of clinical stigmata of chronic liver disease, laboratory data, or imaging findings. Patients were excluded if ascites was not related to chronic liver disease.

Participants from the University Hospitals of Geneva, Switzerland, and Besançon, France, were consecutively enrolled between 2005 and 2007. The decision to perform a paracentesis was made by the attending physician (inpatients) or by the primary care physician (outpatients), who thereafter referred the patient for the procedure.

The physician performing the procedure had the possibility to use an ultrasound device, if needed, to identify the most appropriate site of puncture. Clinical and laboratory data were recorded at the time of paracentesis. Follow-up information on complications was collected in the hospital or by asking the patient in the case of outpatient procedures for 3 days after paracentesis.

The preferred site for needle insertion was in the left lower quadrant.<sup>17,18</sup> The aspirating catheter consisted of a metal introducer needle with an outer plastic sheath and a diameter of 16-22 gauge (Venflon; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, or Abbocath-T; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). The cannula was fixed to the abdominal wall and connected with plastic tubing to a graduated canister until the complete emptying of the peritoneal fluid by declivity. If interruption of the ascitic fluid could not be corrected by changing the position of the patient, the catheter was withdrawn. In this case, a second puncture was repeated only if the physician judged it necessary. At the end of the procedure, pressure was applied over the insertion site, and a cotton gauze sponge was secured with an adhesive bandage. After therapeutic paracentesis, outpatients remained under observation for at least 60 minutes and were

discharged if they were asymptomatic without postural hypotension.

For paracenteses exceeding 5 L, 20% human albumin was administered intravenously at a rate of 8 g/L of ascites. The local ethics committees approved this study, and all patients signed an informed consent form before the paracentesis.

### Statistics

We analysed the risk factors of complications by means of a logistic regression model for repeated measurements by using the generalized estimating equation methodology to account for intrasubject correlations. The analysis was performed by using SAS version 9.1.3 software (SAS Institute Inc, Cary, NC), and the level of significance was established at .05.

## Results

### Patients

We performed 515 abdominal paracenteses in 171 patients with a mean age of 59.6 years. The characteristics of the study population are presented in Supplementary Table 1.

Paracenteses were performed in patients with international normalized ratio values above 3.5 or with a thrombocytopenia below  $50 \times 10^9/L$  in 5.2% and 10.7% of cases, respectively.

### Paracenteses

The features of paracenteses are presented in Supplementary Table 2. During therapeutic paracentesis, the mean volume of ascitic fluid removed was  $4390 \pm 760$  mL, and the largest volume was 20 L.

Ultrasound was used in 11.7% of cases to verify the presence of ascites and the absence of adherent organs to the abdominal wall. It was more frequently performed before diagnostic procedures (20 cases out of 45) than before therapeutic paracentesis (40 cases out of 470),  $P < .0001$  (Fisher test).

The macroscopic aspect of ascites was citrine yellow in 98.3% and grossly hemorrhagic in 1.7% of cases. In 1 case, the color of the aspirated liquid was green-brown, strongly suggesting a procedure-related bowel perforation.

### Technical Problems

There were 5.6% of procedures with technical problems. The characteristics and incidence are described in Table 1. Absence of ascitic fluid at the first puncture and interruption of ascites flow during the procedure often required a second puncture. In 3 cases the puncture failed, and in 1 case the therapeutic procedure was incomplete, with a significant volume of residual ascites in the abdominal cavity.

### Complications

We observed 54 (10.5%) minor or major complications after paracentesis (Table 1).

Minor complications, defined as self-limited problems managed with nursing care, occurred in 46 cases (8.9%). Outflow of ascitic fluid from the puncture site or local bleeding were observed in 5% and 2.3% of cases, respectively. In 4 cases the outflow of ascites was important enough to warrant the application of a stoma-pouch until it spontaneously stopped. There were no reported cases of clinically relevant hypotension after the procedure.

**Table 1.** Technical Problems and Complications of Paracentesis

Total number of procedures	515
Technical problems	
Procedure with	
no technical problems	486 (94.4%)
one or more technical problems	29 (5.6%)
Technical problems <sup>a</sup>	
No ascites at the first puncture attempt	32 (6.2%)
Need for repositioning of the catheter due to ascites flow interruption	33 (6.4%)
Need for a second puncture during the same procedure due to flow interruption	50 (9.7%)
Incomplete procedure due to interruption of flow	9 (1.7%)
Need for a longer catheter	6 (1.2%)
Slipping of the catheter from the abdominal wall	3 (0.6%)
Catheter residue broken into abdominal wall	1 (0.2%)
Complications	
Procedure with	
no complications	461 (89.5%)
minor complications	46 (8.9%)
major complications <sup>b</sup>	8 (1.6%)
Complications	
Small bowel perforation <sup>b</sup>	2 (0.4%)
Iatrogenic percutaneous infection of ascites <sup>b</sup>	1 (0.2%)
Ascites outflow at the puncture site after the procedure	26 (5.0%)
Self-limited	15 (2.9%)
Necessitating a stoma pouch	11 (2.1%)
Bleeding after the procedure	17 (3.3%)
Minor, self-limited	12 (2.3%)
Major <sup>b</sup>	5 (1.0%)

<sup>a</sup>More technical problems might have been observed in the same procedure.

<sup>b</sup>Necessitating a medical or surgical intervention.

There were 8 major complications (1.6%), defined as necessitating a specific medical intervention. Only one of these patients, who had a platelet number less than  $50 \times 10^9/L$ , received abdominal ultrasound. Hemorrhagic complications included 2 cases of major hematoma and 3 cases of bleeding into the peritoneal cavity. The 3 infections were due to small bowel perforation and to a probable external contamination of ascites (staphylococcal bacteria in the analysis of ascites). Two patients, who were not operable, died after paracentesis as a result of intraperitoneal bleeding and of secondary peritonitis after a small bowel perforation.

The analysis of risk factors associated with major complications of paracentesis is presented in Table 2. Major complications were significantly associated with therapeutic but not diagnostic procedures. Multivariate analysis also suggested other risk factors, such as alcoholic etiology of cirrhosis, blood platelet count  $<50 \times 10^9/L$ , and Child-Pugh C stage, whereby the  $P$  value ranging between .07 and .09 failed to reach statistical significance.

The analysis of risk factors associated with all complications (minor and major) showed that patients with advanced liver disease (Child-Pugh class C versus A-B) were at increased risk of experiencing problems after the procedure (relative risk, 2.15; 95% confidence interval, 1.22–3.80;  $P = .009$ ).



**Table 2.** Relative Risk of Developing Major Short-Term Complications After Paracentesis

Factor	Univariate analysis				Multivariate analysis <sup>a</sup>			
	P value	RR	LL	UL	P value	RR	LL	UL
Multiple vs unique paracenteses	.432	1.89	0.39	9.23				
Inpatient vs outpatient procedure	NE	NE	NE	NE				
Diagnostic only vs therapeutic procedure	.012	0.16	0.04	0.66	.0157	0.16	0.03	0.70
Small vs large volume (>5 L) ascites	NE	NE	NE	NE				
Alcoholic vs other etiology of cirrhosis	.095	3.15	0.82	12.13	.0897	3.40	0.83	13.96
Previous SBP	.259	0.43	0.10	1.85				
Experience of the operator								
< 20 versus 20–50 paracenteses	.991	1.01	0.09	11.14				
> 50 paracenteses	.130	3.49	0.69	17.62				
No abdominal ultrasound performed before procedure	.805	0.78	0.11	5.39				
Occurrence of technical problem(s) during the procedure	.414	2.42	0.29	20.40				
Unique vs repeated puncture in the same procedure	.854	0.82	0.10	7.02				
Blood platelet count $\geq 50 \times 10^9/L$	.030	0.20	0.05	0.86	.0757	0.25	0.06	1.15
INR	.180	2.79	0.62	12.50				
Plasma creatinine >150 $\mu\text{mol/L}$	.102	3.36	0.79	14.36				
Child-Pugh classification C vs A or B	.073	6.95	0.83	58.12	.0958	6.24	0.72	53.82

RR, relative risk; LL, lower limit of 95% confidence interval; UL, upper limit of 95% confidence interval; SBP, spontaneous bacterial peritonitis; INR, international normalized ratio; NE, not estimated.

<sup>a</sup>Only variables with  $P < .10$  were fitted for the multivariate analysis.

## Discussion

In this prospective study we assessed incidence and characteristics of complications and technical problems of paracentesis.

Therapeutic procedures, in contrast to diagnostic ones, were associated with an increased risk of major complications. Child-Pugh class C, platelet count  $< 50 \times 10^9/L$ , and alcoholic liver disease showed a trend toward association with an increased risk of major complications, although their correlations did not reach statistical significance.

Mortality as a direct consequence of a major complication of paracentesis was 0.4%. This occurred in patients who were not operable as a result of their poor general conditions. Therefore, we believe that in operable patients, death as a result of paracentesis should be considered an exceptional event.

The data presented here also include novel information on the nature and incidence of technical problems. This issue has never been addressed in previous studies and emphasizes the occurrence of failures at the first puncture attempt and the need of repositioning the cannula and of repeating the puncture during the same procedure. Independently from their characteristics, technical problems were not associated with an increased incidence of complications after paracentesis.

The relatively high incidence of ascitic fluid leak in our study (5%) might reflect a more accurate search for this complication. This complication might be prevented by a simple postural procedure consisting of asking patients to rest on the side contrary to the paracentesis site. However, because this was not recommended in our hospitals, we were not able to evaluate it in this study.

Abdominal ultrasound was more frequently used before diagnostic than before therapeutic paracentesis. It correlated with the absence of fluid at first puncture and with the repositioning of the needle caused by interruption of flow, suggesting that sonography was used in patients in whom problems with the procedure were a priori expected. Because ultrasound might

reduce the incidence of complications, further studies to evaluate its role before paracentesis are needed.

An increased incidence of complications has not been observed when the international normalized ratio was pathologically increased, suggesting that the administration of coagulation factors might not be indicated to prevent paracentesis-related bleedings.

This study was conducted in cirrhotic patients, so that our data on complications and risk factors might not be extended to patients with ascites of other etiology.

On the basis of the present findings, should our practice change? This study suggests that paracentesis should be performed with caution when the platelet count is below  $50 \times 10^9/L$ . In these patients, the administration of platelets, the performance of paracentesis under ultrasound guidance, more accurate monitoring after the procedure, and particular patient information concerning the risk of complications should be considered.

In conclusion, these findings might contribute to better identifying those patients at risk of major complications after abdominal paracentesis, offering the opportunity for better risk assessment, for improving patient information, and for initiatives to limit or avoid complications of paracentesis.

## Supplementary Data

Note: To access the supplementary materials accompanying this article, visit the online version of *Clinical Gastroenterology and Hepatology* at [www.cghjournal.org](http://www.cghjournal.org).

## References

1. D'Amico G, Morabito A, Pagliaro L, et al. Survival and prognostic indicators in compensated and decompensated cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1986;31:468–475.
2. Gines P, Cardenas A, Arroyo V, et al. Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med* 2004;350:1646–1654.



3. Garcia-Tsao G. The transjugular intrahepatic portosystemic shunt for the management of cirrhotic refractory ascites. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:380–389.
4. Gines P, Arroyo V, Quintero E, et al. Comparison of paracentesis and diuretics in the treatment of cirrhotics with tense ascites: results of a randomized study. *Gastroenterology* 1987;93:234–241.
5. Salerno F, Badalamenti S, Incerti P, et al. Repeated paracentesis and i.v. albumin infusion to treat “tense” ascites in cirrhotic patients: a safe alternative therapy. *J Hepatol* 1987;5:102–108.
6. Salerno F, Camma C, Enea M, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for refractory ascites: a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology* 2007;133:825–834.
7. Luca A, Garcia-Pagan JC, Bosch J, et al. Beneficial effects of intravenous albumin infusion on the hemodynamic and humoral changes after total paracentesis. *Hepatology* 1995;22:753–758.
8. Runyon BA. Paracentesis of ascitic fluid: a safe procedure. *Arch Intern Med* 1986;146:2259–2261.
9. Runyon BA. Management of adult patients with ascites caused by cirrhosis. *Hepatology* 1998;27:264–272.
10. Grabau CM, Crago SF, Hoff LK, et al. Performance standards for therapeutic abdominal paracentesis. *Hepatology* 2004;40:484–488.
11. Mallory A, Schaefer JW. Complications of diagnostic paracentesis in patients with liver disease. *JAMA* 1978;239:628–630.
12. Minocha A. A fatal case of paracentesis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:856.
13. Pache I, Bilodeau M. Severe haemorrhage following abdominal paracentesis for ascites in patients with liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:525–529.
14. Webster ST, Brown KL, Lucey MR, et al. Hemorrhagic complications of large volume abdominal paracentesis. *Am J Gastroenterol* 1996;91:366–368.
15. Arnold C, Haag K, Blum HE, et al. Acute hemoperitoneum after large-volume paracentesis. *Gastroenterology* 1997;113:978–982.
16. McVay PA, Toy PT. Lack of increased bleeding after paracentesis and thoracentesis in patients with mild coagulation abnormalities. *Transfusion* 1991;31:164–171.
17. Sakai H, Sheer TA, Mendler MH, et al. Choosing the location for non-image guided abdominal paracentesis. *Liver Int* 2005;25:984–986.
18. Thomsen TW, Shaffer RW, White B, et al. Videos in clinical medicine: paracentesis. *N Engl J Med* 2006;355:e21.

---

#### *Reprint requests*

Address requests for reprints to: Dr Andrea De Gottardi, Hepatic Hemodynamic Laboratory, Liver Unit, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. e-mail: [andrea.degottardi@gmail.com](mailto:andrea.degottardi@gmail.com); fax: (34) 93-227-93-48.

#### *Acknowledgments*

The authors kindly acknowledge the expert help of Nicola van Berckel in preparing the manuscript.

#### *Conflicts of interest*

The authors disclose no conflicts.

#### *Funding*

A.D.G. is supported by a Sheila Sherlock Fellowship from the European Association for the Study of the Liver and by the Swiss Foundation for Grants in Biology and Medicine.

## **Position du problème**

Comme nous l'avons évoqué au début de cette thèse, l'ascite est une complication spectaculaire marquant un tournant dans l'histoire naturelle de la cirrhose. Tout patient cirrhotique présentant une ascite à son admission, que ce soit dans le cadre de l'urgence ou en hospitalisation conventionnelle, devrait avoir une paracentèse pour explorer le liquide d'ascite et éliminer une infection. La paracentèse est un geste classiquement sûr, ne nécessitant pas de précautions particulières vis à vis des troubles de l'hémostase inhérents au patient cirrhotique [246]. Une étude américaine avait montré que la prévalence des complications post-paracentèses n'était pas différente si la paracentèse était réalisée par une infirmière ou un médecin [130] ; dans l'étude de Grabau et al. la réalisation de 10 procédures paraissaient suffisante pour réaliser ce geste en toute sécurité [132]. Toutefois, des complications sévères ont été rapportées, comme des hémorragies, des perforations intestinales avec péritonite et abcès [183], mais semblent exceptionnelles si la paracentèse est faite dans les règles de l'art [180, 246, 248]. Il est difficile de chiffrer l'incidence de ces complications essentiellement rapportées rétrospectivement ou sous forme de cas cliniques [132, 183, 197, 223, 322]. De plus, la plupart de ces études se sont focalisées uniquement sur le risque hémorragique [29, 193, 223, 322]. Une revue systématique récente publiée dans JAMA notait qu'une hémorragie « significative » était rapportée dans 0 à 2,7% des paracentèses [327].

Un grand nombre de ces patients vont subir des paracentèses répétées, surtout si l'ascite devient réfractaire (environ 10% des patients) ; il nous apparaissait donc opportun de recueillir prospectivement tous les problèmes techniques et les complications mineures et sévères de la paracentèse afin d'identifier dans un second temps les facteurs de risque associés à ces complications.

## **Elaboration de la recherche**

L'équipe de Besançon a pris une grande part dans l'élaboration de ce projet réalisé sous l'impulsion des Drs De Gottardi et Hadengue du service d'Hépatologie de l'hôpital universitaire de Genève. Notre contribution principale, outre l'inclusion des patients, a été l'élaboration de la fiche de recueil de données à compléter lors de chaque paracentèse.

Les patients inclus dans cette étude avaient tous une cirrhose diagnostiquée sur des critères histologiques ou sur les données cliniques, biologiques ou radiologiques. La paracentèse pouvait avoir lieu soit en hôpital de jour (patient ambulatoire), soit en hospitalisation conventionnelle.

Les données à recueillir concernaient des données démographiques habituelles du patient, des données biologiques (destinées notamment à connaître le degré de sévérité de la cirrhose), le matériel utilisé pour la ponction (type d'aiguille et son diamètre), le caractère expérimenté ou non de la personne réalisant le geste en fonction du nombre de ponctions réalisées dans le passé (< 20, entre 20 et 50, > 50 ponctions). Les médecins étaient libres d'utiliser ou non une sonde d'échographie avant le geste pour localiser une ascite de faible abondance. Après chaque ponction, les patients étaient mis en observation durant 60 minutes. Les paracentèses excédant 5 litres d'ascite étaient compensées par une ou plusieurs perfusions de 100 mL d'albumine à 20% (soit 8 g d'albumine par litre d'ascite ponctionnée). Les informations concernant les éventuelles complications techniques ou médicales étaient recueillies dans les trois jours suivant la ponction ; pour les patients ambulatoires, ces données étaient recueillies directement auprès des patients ou de leur médecin traitant.

### **Statistiques**

L'analyse des résultats a été faite par le laboratoire de Biostatistique et d'Epidémiologie de Barcelone (Dr Torres F.). L'analyse des facteurs de risque des complications a été faite avec un modèle de régression logistique adapté aux mesures répétées, prenant ainsi en compte les corrélations intra-classes.

### **Résultats**

Nous avons pu analyser 515 paracentèses obtenues chez 171 patients âgés en moyenne de 60 ans. La provenance des patients était bien équilibrée entre les deux centres puisque 48,3% des paracentèses provenaient du service d'Hépatologie de Besançon. Environ 5% des patients avait un INR > 3,5 et 11% avait des plaquettes < 50000/mm<sup>3</sup>. Les paracentèses étaient thérapeutiques (c'est-à-dire évacuatrices) dans 470 cas (91,2%) et diagnostiques (c'est-à-dire exploratrices) dans 45 cas (8,8%). Pour les paracentèses diagnostiques, l'échographie avait précédé le geste dans 11,7% des cas. L'aspect de l'ascite était majoritairement de couleur citrin (98,3%) et plus rarement hémorragique (1,7%).

Nous avons recensé un ou plusieurs problèmes techniques dans 5,6% des cas (n=29) le plus souvent en rapport avec soit l'absence d'ascite à la première ponction, soit la nécessité de repositionner le cathéter du fait d'un arrêt de l'écoulement d'ascite. Nous avons observé 54 complications (10,5%), 46 (8,9%) d'entre-elles étaient considérées comme « mineures » et 8 (1,6%) comme « majeures » car nécessitant une intervention médicale.

Les complications mineures étaient souvent résolues par l'infirmière et consistaient principalement en : 1) une fuite d'ascite post-paracentèse (5%, n=26) nécessitant un collecteur temporaire pour près de la moitié de ces fuites, et 2) un petit hématome dans 12 cas (2,3%). Nous n'avons pas remarqué de chute de la pression artérielle dans l'heure suivant les ponctions.

De façon beaucoup plus inquiétante, nous avons rencontré 8 complications majeures (1,6%) :

- 5 cas de saignement : 2 hématomes très étendus et 3 hémorragies intra-péritonéales
- 3 infections du liquide d'ascite probablement par contamination externe (présence de staphylocoque dans l'ascite)

Deux de ces patients ayant eu une complication majeure sont décédés suite à une hémorragie intra-péritonéale pour l'un et une péritonite probablement par perforation intestinale pour l'autre patient.

La prévention de ces complications, en particulier les complications « majeures », constitue un enjeu important pour le clinicien. En analyse univariée, les facteurs associés au risque de complications majeures étaient : la paracentèse thérapeutique plutôt que diagnostique ( $P=0,012$ ) et un taux de plaquettes  $< 50000/\text{mm}^3$  ( $P=0,03$ ) ; deux autres variables étaient à la limite de la significativité : l'appartenance à la classe C de Child-Pugh (vs A ou B ;  $P=0,073$ ) et l'origine alcoolique de la cirrhose (vs autres causes ;  $P=0,095$ ). L'analyse multivariée avait inclus les variables ayant un  $P < 0,10$  en analyse univariée, et seule la paracentèse thérapeutique plutôt que diagnostique ( $P=0,015$ ) conservait sa significativité.

Lorsqu'on analysait l'ensemble des complications (mineures et majeures), seule la classe C (vs A ou B ;  $P=0,009$ ) de Child-Pugh était prédictive du risque de complication.

## **Commentaires**

Le message important de cette étude est qu'il ne faut pas négliger l'acte de paracentèse réalisée chez les patients cirrhotiques avec ascite. La mortalité non nulle (0,4%) rapportée dans notre série doit nous faire réfléchir sur les précautions à prendre devant ce geste médical réalisé avec une grande fréquence. Le fait que ce soit la paracentèse thérapeutique (grand volume d'ascite évacué) plutôt que diagnostique qui est associée au risque de complication majeure pourrait s'expliquer par l'utilisation plus fréquente de l'échographie devant une ascite de faible volume ; ainsi, le praticien peut facilement distinguer l'endroit à ponctionner et éviter de blesser une anse intestinale par exemple. Bien sûr cette option de l'utilisation systématique de l'échographie en cas d'ascite peu abondante mériterait une évaluation clinique plus approfondie. Par ailleurs, une paracentèse

thérapeutique avec une aiguille laissée en place sans surveillance peut devenir traumatique lorsque l'ascite a été totalement évacuée ; il nous paraît donc important de sensibiliser les étudiants et les équipes para-médicales de retirer rapidement l'aiguille dès que l'ascite ne s'évacue plus.

D'un point de vue très pratique, il faudra faire particulièrement attention aux paracentèses réalisées chez des patients cirrhotiques alcooliques ayant une fonction hépatique dégradée (Child-Pugh C) et des plaquettes basses ( $< 50000/\text{mm}^3$ ) ; peut-être qu'un médecin « sénior » devrait superviser l'étudiant non expérimenté réalisant ce geste chez ce type de patient. Observons cependant que dans notre étude, le caractère « expérimenté » ( $> 20$  ou  $> 50$  paracentèses) du médecin réalisant le geste ne ressortait pas comme facteur prédictif de complications post-paracentèses. On peut s'étonner que l'INR ne soit pas un facteur de risque de complications mais cela est probablement lié au fait que, dans notre série, nous n'avions que peu de patients ayant des INR très élevés (5% seulement avec un  $\text{INR} > 3,5$ ). Il n'y a pas actuellement de données suffisantes pour promouvoir la correction des troubles de la coagulation par l'administration de produits dérivés du sang avant une paracentèse mais il est recommandé par les sociétés savantes une grande attention en présence d'une thrombopénie [200]. L'existence d'une fibrinolyse évidente ou d'une coagulation intra-vasculaire disséminée sont des conditions devant faire reculer la paracentèse pour certains experts [248]. Un point réconfortant est l'absence de complications parmi les 612 paracentèses réalisées chez des patients avec des plaquettes  $< 50000/\text{mm}^3$  [132]. Dans cette étude, l'INR s'étendait de 0,9 à 8,7 et les plaquettes de 19000 à  $341000/\text{mm}^3$  ; la seule complication mineure hémorragique survenait chez un patient ayant un chiffre de plaquette à  $64000/\text{mm}^3$ .

Les problèmes d'ordre technique n'engagent pas ici le pronostic vital des patients, mais ne sont pas si rares ( $> 10\%$ ) et peuvent parfois retarder la sortie d'hospitalisation, notamment pour les fuites d'ascite jugées importantes, engendrant un surcoût non négligeable. Ces fuites d'ascite pourraient être évitées ou mieux contrôlées en positionnant le patient allongé du côté opposé à sa paracentèse ; toutefois cela n'a pas été démontré à ma connaissance et pourrait faire l'objet d'une évaluation clinique compte tenu de la fréquence de cette complication mineure.

## **Conclusion**

Nos résultats ont contribué à mieux identifier les patients cirrhotiques à haut risque de complications majeures après une paracentèse. L'identification de ce groupe de sujets à risque de complications post-paracentèse (cirrhose alcoolique, Child-Pugh C avec un taux de plaquettes  $< 50000/\text{mm}^3$ ) va certainement focaliser l'attention des cliniciens sur ces

patients et peut-être faire envisager la transfusion de plaquettes ou l'utilisation plus fréquente de la ponction échoguidée.

### **3.2) Article 2**

**Thévenot T**, Cadranet JF, Nguyen-Khac E, Tilmant L, Tiry C, Welty S, Merzoug N.

Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in  
cirrhotic patients by use of two reagent strips

*Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;6:579-83.

# Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients by use of two reagent strips

Thierry Thévenot<sup>a</sup>, Jean-François Cadranel<sup>b</sup>, Eric Nguyen-Khac<sup>a</sup>,  
Laetitia Tilmant<sup>a</sup>, Catherine Tiry<sup>a</sup>, Stéphane Welty<sup>a</sup> and Nouredine Merzoug<sup>c</sup>

**Objective** Spontaneous bacterial peritonitis (SBP) is one of the potentially life-threatening complications in ascitic cirrhotic patients with a mortality rate ranging between 30% and 50%. The improved survival might be explained by a more rapid diagnosis and treatment. The aim of our study was to assess the utility of two reagent strips, the Multistix<sup>®</sup> test and the Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN, for the rapid diagnosis of SBP.

**Methods** Thirty-one unselected consecutive cirrhotic patients with ascites were included and a total of 100 paracenteses were performed. All ascitic fluid was analysed with the two reagent strips, leukocyte and polymorphonuclear (PMN) leukocyte cell count and blood-bottle culture if the strips were positive. The strips were considered positive if the colour turned to purple: i.e. grade 3 or 4 for the Multistix<sup>®</sup> test and 2 or 3 for the Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN on a colorimetric scale.

**Results** We diagnosed nine infections of which four were SBP defined by PMN  $\geq 250$  cells/mm<sup>3</sup> and a positive culture in ascitic fluid and five were culture negative neutrocytic ascites (PMN  $\geq 250$  cells/mm<sup>3</sup> and a negative

culture). The results of the two strips were concordant and were negative in only one SBP. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of these two strips were of 89%, 100%, 100% and 99%, respectively.

**Conclusions** These reagent strips are very sensitive and specific for the diagnosis of SBP, allowing immediate commencement of empirical antibiotic therapy. These strips should be used for the diagnosis of SBP, especially on an emergency basis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16: 1–5 © 2004 Lippincott Williams & Wilkins

European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2004, 16:1–5

**Keywords:** cirrhosis, spontaneous bacterial peritonitis, reagent strip

<sup>a</sup>Service d'Hépatogastroentérologie, Hôpital de Cambrai, <sup>b</sup>Service d'Hépatogastroentérologie et de Diabétologie, Boulevard Laennec, Creil, and <sup>c</sup>Service de Médecine Polyvalente, Hôpital d'Hirson, France.

Correspondence to Dr Thierry Thévenot, Service d'Hépatogastroentérologie, Centre Hospitalier de Cambrai, BP 389, 516 avenue de Paris, 59407 Cambrai cedex, France.  
Tel: +33 327 737331; fax: +33 27 73 76 59;  
e-mail: thierry.thevenot@ch-cambrai.rss.fr

Received 25 June 2003

Accepted 24 December 2003

## Introduction

Spontaneous bacterial peritonitis (SBP) is one of the potentially life-threatening complications in cirrhotic patients with ascites. The prevalence of SBP in unselected hospitalized cirrhotic patients with ascites ranges between 10 and 30% [1]. Approximately half the episodes of SBP are present at the time of hospital admission and the remainder are acquired during hospitalization [2–4]. Although empirical antibiotic therapy is initiated immediately after the diagnosis of SBP, without knowledge of the causative organisms and their *in vitro* susceptibility, the overall in-hospital mortality rate remains high, ranging between 30 and 50% [3–6]. SBP is considered an indication for liver transplantation because the prognosis after the first episode of SBP is extremely poor [7]. Diagnosis of SBP is highly probable when the polymorphonuclear leukocytes (PMN) cell count in ascitic fluid reaches the cut-off of 250/mm<sup>3</sup>. Once this cut-off is reached, the antibiotic therapy must be started without waiting for a culture from ascitic fluid. The improved survival might, in part, be explained by a more rapid diagnosis and

treatment by avoiding occurrence of a septic shock, a condition well known for its frequently fatal outcome [8]. Use of reagent strip testing for leukocyte esterase has been proposed to reduce the time from paracentesis to a presumptive diagnosis of SBP from a few hours to a few seconds. Only five prospective studies [9–13], assessed the diagnostic accuracy of reagent strips for the rapid diagnosis of SBP in ascitic cirrhotic patients. The aims of this new prospective study were (1) to assess the utility in clinical practice of two reagent strips (the Multistix<sup>®</sup> test and the Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN) for the rapid diagnosis of SBP or culture negative neutrocytic ascites (CNNA) in a primary referral hospital (i.e. non-academic hospital) and (2) to compare the accuracy of these two strips manufactured by two different laboratories.

## Patients and methods

### Patients

Between April 2002 and April 2003, 31 consecutive unselected cirrhotic patients with ascites were included in our study and a total of 100 paracenteses were



performed. Sixty-nine paracenteses were performed routinely in an outpatient setting for refractory ascites and 31 during classical hospitalizations (this group was called inpatients). Paracenteses were systematically performed in 23 asymptomatic inpatients to investigate new onset of ascites and clearly done to confirm symptoms suggestive of peritoneal infection in the other eight inpatients. The number of paracenteses per patient ranged between 1 and 15 with an average of 3.2.

Diagnosis of cirrhosis was established by histological criteria ( $n = 7$ ) and/or by clinical, laboratory, endoscopic and/or ultrasonographic findings ( $n = 24$ ). The aetiology of cirrhosis was alcohol in 30 patients and chronic viral hepatitis B in the last patient. All subjects had evidence of advanced liver disease with 32% ( $n = 10$ ) Child-Pugh class B and 68% ( $n = 21$ ) Child-Pugh class C. One patient was awaiting liver transplantation. We also screened these patients for other causes of chronic liver disease (hepatitis C virus, primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and metabolic disease such as genetic haemochromatosis or  $\alpha_1$  anti-trypsin deficiency) but none of them had these associated causes of liver disease. No patients had anti-HIV antibodies, secondary peritonitis, corticosteroid treatment, or history of a previous episode of SBP at their first presentation.

#### Diagnostic criteria

The diagnostic criteria of SBP were (1) ascitic fluid PMN count greater than  $250/\text{mm}^3$ , (2) a positive ascitic fluid culture, and (3) absence of intra-abdominal sources of infection or inflammation. The diagnostic criteria of CNNA were (1) ascitic fluid PMN count greater than  $250/\text{mm}^3$ , (2) a negative ascitic fluid culture, (3) absence of intra-abdominal sources of infection, and (4) absence of previous antibiotic therapy. We also defined bacterascites as the combination of (1) a positive ascitic fluid culture, (2) an ascitic fluid neutrophil count  $< 250/\text{mm}^3$ , and (3) no evident intra-abdominal surgically treatable source of infection. In patients with haemorrhagic ascites (i.e. ascites red blood cell count  $> 10\,000/\text{mm}^3$ ), a subtraction of one PMN per 250 red blood cell was made [1]. Secondary peritonitis was suspected when there was an abdominal source of infection, acute pancreatitis, or more than one organism in the ascitic fluid culture.

#### Technique of visual reading

Immediately after the paracentesis, the ascitic fluid was tested by use of two reagent strips for leukocyte esterase designed for rapid urine screening test: (1) The Multistix<sup>®</sup> test (Bayer Diagnostics Corporation, Puteaux, France), and (2) The Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN (Roche Diagnostics, Meylan, France). In brief, fresh ascite was collected in a clean dry container and the

strip was immediately immersed in ascite. We ran the edge of the strip against the rim of the container to remove excess ascite. Thereafter we compared closely test areas with the colour chart on the bottle label between 1 and 2 min. The strips were read by the physician who carried out the paracentesis and he was unaware of the results of cytological and bacteriological tests. These two strips had a colorimetric 5-grade scale (from 0 to 4) and 4-grade scale (from 0 to 3) for the Multistix<sup>®</sup> test and the Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN, respectively. A correlation between PMN and the 5-grade scale was suggested by the manufacturer as follows: grade 0, 0 PMN/ml; grade 1, 15 PMN/ml; grade 2, 70 PMN/ml; grade 3, 125 PMN/ml; and grade 4, 500 PMN/ml. For the Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN, the correlation was grade 0, 0 PMN/ml; grade 1, 25 PMN/ml; grade 2, 75 PMN/ml; grade 3, 500 PMN/ml. However, to simplify the procedure, the reagent strip was considered positive if the colour turned to purple, i.e. if the grade was 3 or 4 for the Multistix<sup>®</sup> test and grade 2 or 3 for the Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN. We have chosen to consider as positive the strip with the grade 3 (125 PMN/ml) for the Multistix<sup>®</sup> test and the grade 2 (75 PMN/ml) for the Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN because the grade 4 (500 PMN/ $\text{mm}^3$ ) and 3 (500 PMN/ $\text{mm}^3$ ) of these two strips were above the cut-off of 250 PMN/ $\text{mm}^3$  defining SBP. As a result of this lower cut-off of the positive strips we expected to detect Gram positive cocci SBP because Campillo *et al.* observed that most patients with SBP caused by Gram positive cocci had PMN counts lower than the threshold of 250 PMN/ $\text{mm}^3$  [14]. Laboratory analysis of the ascitic fluid in all patients used a standard sterile technique and included the following: total and differential cell counts, Gram stain and total protein levels. When the strip was positive, we repeated the test to confirm it. When the strip was confirmed positive or when SBP was suspected as a result of clinical examination, we performed bacterial cultures by inoculation of 10 ml of ascitic fluid into each aerobic and anaerobic blood culture bottle at the bedside [15]. When SBP was diagnosed, diuretics were stopped and a second paracentesis was performed at 48 h to control infection outcome after initiation of antibiotics. The Multistix<sup>®</sup> test and Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN strip are priced at 0.4 euro and 0.29 euro, respectively.

Blood was obtained simultaneously for routine haematological, biochemical and coagulation studies.

#### Statistical analysis

Data are presented as means  $\pm$  SD for quantitative variables and as frequencies for qualitative variables. We determined the sensitivity, the specificity, the positive predictive value and the negative predictive value of these reagent strips.



## Results

We performed 100 paracenteses in 31 cirrhotic patients from April 2002 to April 2003 in our primary referral hospital. Clinical and biological characteristics of these patients at the first presentation are presented in Tables 1 and 2. Nine of these paracenteses had SBP defined by an absolute neutrophil count of  $\geq 250$  cells/mm<sup>3</sup>, and one SBP was a recurrence. Only four of these nine ascitic fluid cultures grew. Among the nine SBP, eight (89%) were symptomatic at the time of hospital admission (Table 3). SBP was diagnosed in only one out of 69 outpatients (1.4%). Among the five patients with CNNA, two received oral antibiotics (one for a secondary prevention of SBP and the one for an urinary tract infection). Antibiotic therapy for SBP consisted of 1 week of amoxicillin-clavulanic acid (1 g–0.2 g/8 h) first intravenously, then orally when the patient's condition allowed. Patient follow-up after SBP included a repeat paracentesis at 48 h. Once antibiotherapy initiated, the clinical course of these nine

SBP was marked by a prompt resolution of the symptoms in all but one dying patient in an encephalopathic coma. We also observed one bacterascites with a spontaneous clearance.

At the threshold of 250 PMN/mm<sup>3</sup> in ascitic fluid, the sensitivity, the specificity, the positive predictive value and the negative predictive value are respectively of 89%, 100%, 100% and 99%. These results were strictly the same with the Multistix<sup>®</sup> test and the Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN.

## Discussion

The reagent strips testing for leukocyte esterase were initially manufactured for the rapid diagnosis of urinary infection but they have been successfully proposed for the diagnosis of meningitis, empyema, peritonitis in patients on peritoneal dialysis, vaginal infection or otitis [16–19]. The test is based on the esterase activity of granulocytes. 3-Hydroxy-5-phenyl-pyrrole esterified with an amino acid is used as the substrate. Hydrolysis of this ester by the esterase releases 3-hydroxy-5-phenyl-pyrrole, which in turn reacts with a suitable diazonium salt, yielding a purple colour. Only five prospective studies [9–13], three of which published only in abstract form at time of writing [11–13], assessed the diagnostic accuracy of reagent strips for the rapid diagnosis of SBP in ascitic cirrhotic patients. In the study of Delaunay-Tardy *et al.*, the Multistix 8SG was read instrumentally, using the CLINITEK 50<sup>®</sup> Urine Chemistry Analyser (Bayer diagnostics). These authors found a low sensitivity (60%), which made this automated system unsuitable for the detection of SBP [12]. Our prospective study confirms the high accuracy of two different reagent strips for the diagnosis of SBP in cirrhotic patients, consistent with the recent previous reports (Table 4). We can not explain the only one misclassified SBP in our study with the two strips, but we can hypothesize that the time between immersing the strip and visually reading the result might be too short. Also, we can not rule out

**Table 1 Clinical characteristics of 31 cirrhotic patients who underwent 100 paracenteses**

Characteristic	Mean $\pm$ SD, or number
Female gender	18 (58%)
Age (years)	59 $\pm$ 9.4 (range, 45–78)
Child–Pugh classification (A/B/C)	0/10/21
Aetiology of cirrhosis (alcohol/viral hepatitis B)	30/1

**Table 2 Biological characteristics of 31 cirrhotic patients who underwent 100 paracenteses**

Characteristic	Mean $\pm$ SD, or number
Serum albumin (g/l)	25 $\pm$ 5.7 (10–40)*
Serum bilirubin (mg/l)	40 $\pm$ 56 (2–239)
Prothrombin time (%)	60 $\pm$ 16 (31–87)
Serum creatinine (mg/l)	9.8 $\pm$ 6.3 (3–34)
Serum urea (g/l)	0.45 $\pm$ 0.5 (0.08–2.4)
Platelets level (/mm <sup>3</sup> )	166 300 $\pm$ 88 330 (46 000–3 490 000)

\*Values in parentheses are the minimum to maximum.

**Table 3 Details concerning the four spontaneous bacterial peritonitis and the five culture negative neutrocytic ascites**

Patient number	In- or out patient	Symptoms	Results of the strips	PMN cell count (/mm <sup>3</sup> )	Results of the ascitic fluid culture	Patient receiving prior antibiotic therapy
1	Inpatient	Encephalopathy	Positive	1829	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	No
2	Inpatient	Encephalopathy	Positive	2780	0	No
3	Inpatient	Fever	Positive	476	<i>Streptococcus bovis</i>	No
4	Inpatient	Encephalopathy	Positive	12300	0	No
5	Inpatient	Encephalopathy	Positive	3864	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	No
6	Inpatient	No symptom	Positive	350	0	Yes
7	Outpatient	Fever + abdominal pain	Negative	1650	<i>Escherichia coli</i>	No
8	Inpatient	Fever	Positive	1600	0	No
8 (recurrence)	Inpatient	Encephalopathy + abdominal pain + variceal bleeding	Positive	347	0	Yes



**Table 4** Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) reported in previous studies for the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by using different reagent strips

	Butani <i>et al.</i> [11]	Vanbiervliet <i>et al.</i> [9]	Castellote <i>et al.</i> [10]	Delaunay-Tardy <i>et al.</i> [12]	Sapey <i>et al.</i> [13]	Thévenot <i>et al.</i> *
Reagent strips tested	Multistix 10SG	Multistix 8SG	Aution sticks	Multistix 8SG with an automated reading	Nephur-test	Multistix 8SG Combur <sup>2</sup> test <sup>®</sup> LN
Sensitivity (%)	89	100	89	60	80	89
Specificity (%)	99	100	99	98	100	100
PPV (%)	89	100	98	75	100	100
NPV (%)	99	100	97	96	99	99

\*The Multistix 8SG and Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN reagent strips have the same results.

the possibility of a read error on the colorimetric scale of these two strips by the nurse who transcribed this result. However, this new method of diagnosis of SBP is so simple that anybody could have done this work. The diagnosis was confirmed later, after classical cytology of ascitic fluid.

One of the most important points, though, is the prompt diagnosis of SBP in such fragile patients, allowing immediate commencement of empirical antibiotic therapy. The result of the reagent strip can be confirmed later by using classical cytology to determine PMN leukocytes and the lymphocyte count. This cytological examination and differential cell count was made with a conventional optical microscope by a laboratory assistant. However, in our hospital, if the paracentesis is carried out in the late afternoon, classical cytology will be delayed until the next day. Even if laboratory assistants have been trained to do this work, they do not usually prioritize a manual cell count because it takes too much time, particularly when assistants are on night call. This new method of diagnosis is also useful for determining the effectiveness of the antibiotic therapy. In fact, the eight positive results of the strip turned to a negative result after 48 h of antibiotic therapy and this negative result was always confirmed by the PMN cell count. Another interesting and significant aspect is the low cost of these strips in comparison with the classical exploratory paracentesis (cytological and bacteriological analysis) which cost 53 euros [20].

In our study, the incidence of SBP was 9%, lower than previously reported [1]. It is unlikely that this low rate was due to suboptimal culture methods and techniques. This difference can be explained by the source of SBP. In fact, 69% of paracenteses were performed on an outpatient basis and we know the low propensity of SBP in outpatients although they usually present with advanced liver disease. Some biological parameters were theoretically associated with an increased risk of developing SBP: patients with low ascitic fluid protein levels and those with total bilirubin higher than 3.2 mg/dl [21–23]. In our study, blood analysis performed at the same time of paracentesis exhibited ascitic fluid total

protein levels lower than 1.5 g/dl in 42 cases and total bilirubin higher than 3.2 mg/dl in nine cases (data not shown). None of these patients with refractory ascites took antibiotics prior to paracentesis and only one patient developed SBP. Two recent studies confirm the very low prevalence of SBP in asymptomatic outpatients: Evans *et al.* [24] observed 15 patients with SBP among their 427 outpatients during a period of 6 years (prevalence of 3.5%) and Jeffries *et al.* [25] found that none of their 118 paracenteses demonstrated SBP over a 13 month period. In a larger series of asymptomatic cirrhotic outpatients, we observed no SBP or CNNA during a 12 month period [20]. We have no clear reasons to date to explain this significant low prevalence of SBP in asymptomatic outpatients compared to inpatients. One possible explanation would be that inpatients have more severe liver disease and increased risk factors of SBP, such as gastrointestinal bleeding, corticosteroid treatment or severe alcoholic hepatitis, in particular, than do outpatients. With respect to these findings, some authors think that it is unnecessary to culture ascitic fluid in asymptomatic outpatients [20,25].

In our study, only four positive cultures in nine cases of SBP (44%) were observed and three of these cultures concerned Gram positive cocci. This low rate of culture positive SBP has been reported already, with a proportion between 39% and 59% [2,26–28], and probably reflects an earlier diagnosis of the infection. Because of the very small number of positive cultures, we can not speculate about the frequency of Gram positive cocci encountered in community acquired or nosocomial SBP. The source of SBP seems to have therapeutic consequences, since nosocomial organisms are usually more resistant to antibiotics than those acquired in the community. Questioning cirrhotic patients about the possible intake of previous antibiotic therapy could be relevant but probably elusive because such patients frequently have cognitive deficits. General practitioners could be deeply involved in such a study so that antibiotic intake before paracentesis is known exactly.

We observed one bacterascites with a favourable outcome, as previously reported [29]. However, it was not

the issue of this study to look for the prevalence of bacterascites. Asymptomatic bacterascites represent a transient passage of temporally viable bacteria into ascite without an associated inflammatory reaction.

In summary, this is the first study combining two reagent strips for the diagnosis of SBP and we have tested the Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN for the first time. Our results confirm that urine screening tests are highly sensitive and specific for the diagnosis of SBP in cirrhotic patients, whatever the manufacturer. Moreover, this is the first study performed in a non-academic hospital and our results are comparable to those reported by an academic hospital, demonstrating that this accurate method could be used everywhere. In our study, the Multistix<sup>®</sup> test and the Combur<sup>2</sup> test<sup>®</sup> LN have enabled the immediate commencement of antibiotic therapy at very low cost. We consider that the earlier diagnosis of SBP could increase survival in such fragile patients. However, a randomized study that compared the diagnosis of SBP based upon the results of a reagent strip or a manual cell count, on an emergency basis, to prove the increased survival with the rapid method, seems to be unethical. In the lack of such studies, we encourage physicians to use these reagent strips, particularly on an emergency basis.

#### Conflict of interest

There is no conflict of interest for our study

#### Authors' contributions

Thierry Thévenot had the original idea for this study and treated most of the patients. Jean-François Cadranel revised my manuscript. Eric Nguyen-Khac, Laetitia Tilmant, Stéphane Wely and Noureddine Merzoug treated some patients. Catherine Tiry carried out laboratory analysis of the ascitic fluid.

#### References

- Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddok LJV, Planas R, Bernard B, *et al.* Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. *J Hepatol* 2000; **32**:142–153.
- Navasa M, Follo A, Llovet JM, Clemente G, Vargas G, Rimola A, *et al.* Randomized comparative study of oral ofloxacin versus intravenous cefotaxime in spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1996; **111**:1011–1017.
- Toledo C, Salmeron JM, Rimola A, Navasa M, Arroyo V, Llach J, *et al.* Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: predictive factors of infection resolution and survival in patients treated with cefotaxime. *Hepatology* 1993; **17**:251–257.
- Llovet JM, Planas R, Morillas R, Quer JC, Cabré E, Boix J, *et al.* Short-term prognosis of cirrhotics with spontaneous bacterial peritonitis: multivariate study. *Am J Gastroenterol* 1993; **88**:388–392.
- Runyon BA, McHutchinson JG, Antillon MR, Akriviadis EA, Montano AA. Short-course versus long-course antibiotic treatment of spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991; **100**:1737–1742.
- Thuluvath PJ, Mann S, Thompson R. Spontaneous bacterial peritonitis – in-hospital mortality, predictors of survival, and health care costs from 1988 to 1998. *Am J Gastroenterol* 2001; **96**:1232–1236.
- Van Thiel DH, Hassanein T, Gurakar A, Wright HI, Caraceni P, De Maria N, *et al.* Liver transplantation after an acute episode of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatogastroenterology* 1996; **43**:1584–1588.
- Moreau R, Hadengue A, Soupison T, Kirstetter P, Mamzer MF, Vanjak D, *et al.* Septic shock in patients with cirrhosis: hemodynamic and metabolic characteristics and intensive care unit outcome. *Crit Care Med* 1992; **6**:746–750.
- Vanbiervliet G, Rakotoarisoa C, Filippi J, Guerin O, Calle G, Hastier P, *et al.* Diagnosis accuracy of a rapid urine-screening test (Multistix 8SG) in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; **14**:1–4.
- Castellote J, Lopez C, Gomals J, Tremosa G, Rodriguez Farina E, Ballells C, *et al.* Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by the use of reagent strips. *Hepatology* 2003; **37**:893–896.
- Butani RC, Shaffer RT, Szykowski RD, Weeks BE, Speights LG, Kadakia SC. Use of multistix leukocyte esterase dipstick testing for ascitic fluid infection [Abstract]. *Gastroenterology* 2000; **118**(suppl 2):1089A.
- Delaunay-Tardy K, Cottier M, Patouillard B, Audigier JC. Recherche précoce d'une infection du liquide d'ascite par lecture automatisée de bandelettes urinaires Multistix 8 SG: une sensibilité insuffisante. *Gastroenterol Clin Biol* 2003; **27**:A106.
- Sapey T, Fort E, Laurin C, Kabissa D, Strock P, Duranthon P, *et al.* Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis with a urine reagent strip (Nephur-test<sup>®</sup>) [Abstract]. *Gastroenterology* 2003; **124**(suppl 1):144A.
- Campillo B, Richardet JP, Kheo T, Dupeyron C. Nosocomial spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in cirrhotic patients: impact of isolate type on prognosis and characteristics of infection. *Clin Inf Dis* 2002; **35**:1–10.
- Runyon BA, Canawati HN, Akriviadis EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology* 1988; **95**:1351–1355.
- Moosa AA, Quorum HA, Ibrahim MD. Rapid diagnosis of bacterial meningitis with reagent strips. *Lancet* 1995; **345**:1290–1291.
- Azoulay E, Fartoukh M, Galliot R, Baud F, Simonneau G, Le Gall JR, *et al.* Rapid diagnosis of infectious pleural effusions by use of reagent strips. *Clin Infect Dis* 2000; **31**:914–919.
- Sam R, Sahani M, Ulozas E, Leehey DJ, Ing TS, Gandhi VC. Utility of a peritoneal dialysis leukocyte strip in the diagnosis of peritonitis. *Artif Organs* 2002; **26**:546–548.
- Wezyk MT, Malafiej E, Makowski A, Woch G. Bacteriologic evaluation of middle ear fluid during the course of secretory otitis media in children. *Otolaryngol Pol* 2000; **54**:541–546.
- Cadranel JF, Romney R, Mathurin P, Ganne-Carrie N, Halimi C, Medini A, *et al.* Usefulness of routine analysis of ascites fluid at the time of therapeutic paracentesis in asymptomatic cirrhotic outpatients. *J Hepatol* 2002; **36**:55A.
- Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1986; **91**:1343–1346.
- Such J, Guarner C, Enniquet J, Rodriguez JL, Seres I, Vilardell F, *et al.* Low C3 in cirrhotic ascites predisposes to spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1988; **6**:80–84.
- Guamer C, Sola R, Soriano G, Andreu M, Novella MT, Carmen Vila M, *et al.* Risk of first community-acquired spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotics with low ascitic fluid protein levels. *Gastroenterology* 1999; **117**:414–419.
- Evans LT, Kim WR, Poterucha JT, Kamath PS. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology* 2002; **37**:897–901.
- Jeffries MA, Stem MA, Gunaratnam NT, Fontana RJ. Unsuspected infection is infrequent in asymptomatic outpatients with refractory ascites undergoing therapeutic paracentesis. *Am J Gastroenterol* 1999; **94**:2972–2976.
- Fernandez J, Navasa M, Gomez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, *et al.* Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002; **35**:140–148.
- Rimola A, Salmeron JM, Clemente G, Rodrigo L, Obrador A, Miranda ML, *et al.* Two different dosages of cefotaxime in the treatment of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: results of a prospective, randomized, multicenter study. *Hepatology* 1995; **21**:674–679.
- Navasa M, Follo A, Filella X, Jimenez W, Francitorra A, Planas R, *et al.* Tumor necrosis factor and interleukin-6 in spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: relationship with the development of renal impairment and mortality. *Hepatology* 1998; **27**:1227–1232.
- Runyon BA. Monomicrobial non-neutrocytic bacterascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1990; **12**:710–715.

## **Position du problème**

L'infection spontanée du liquide d'ascite (ISLA) une complication fréquente mais reconnue que depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle [131, 196]. Elle touche environ 10-30% des patients hospitalisés pour une ascite [237] et la moitié de ces ISLA sont présentes dès l'admission des patients [177, 209, 297]. Il s'agit d'une complication sévère, associée à une mortalité hospitalière de 20-30% dans les séries les plus récentes [296, 327]. L'amélioration du pronostic de l'ISLA est liée à l'utilisation d'antibiotiques non néphrotoxiques et au maintien d'une volémie efficace par des solutés de remplissage pour éviter l'apparition d'une insuffisance rénale, laquelle est fortement corrélée à la mortalité de ces patients [114, 285], mais avant tout à la rapidité du diagnostic. Les symptômes cliniques peuvent attirer l'attention mais ceux-ci sont peu spécifiques (34%) et peu sensibles (76%) [79]. Le diagnostic d'ISLA se fait classiquement par le décompte des polynucléaires neutrophiles (PNN) dans le liquide d'ascite ( $> 250 /\text{mm}^3$ ) sans tenir compte du résultat de la culture du liquide d'ascite [247, 327]; l'ensemencement du liquide d'ascite, prélevé directement au lit du malade, dans des flacons aérobies et anaérobies permet d'augmenter la sensibilité de cette méthode diagnostique de 65% à 80% [47, 249]. Cette méthode de diagnostic de l'ISLA a cependant quelques écueils incontournables : elle prend du temps avant qu'un résultat ne soit donné (quelques heures) et surtout elle n'est pas toujours disponible à toutes les heures de la journée dans nos hôpitaux car le décompte des PNN se fait au microscope optique par un technicien de laboratoire. Dans ce contexte, l'utilisation des BU qui détectent l'activité estérasique des leucocytes par une réaction colorimétrique pouvait être utile au diagnostic rapide de l'ISLA. Ces BU ont déjà été évaluées dans le diagnostic d'infection méningée, pleural, auriculaire, synovial et péritonéal chez des patients dialysés [201, 235, 253, 323]. En 2004, nous avons dans la région du Nord de la France (Hôpital de Cambrai), une importante population de patient cirrhotique alcoolique, souvent jeune et déjà à des stades compliqués. L'incidence standardisée de la mortalité par cirrhose alcoolique dans la région Nord-Pas-de-Calais en 2004 était deux fois supérieure à celle observée sur l'ensemble du territoire de la France métropolitaine (Source : INSEE, CépiDC - Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès. Traitement : ORS Nord - Pas-de-Calais). A cette époque, cinq études avaient déjà évalué les BU pour le diagnostic de l'ISLA, dont trois rapportées uniquement sous forme de résumé. Nous avons souhaité évaluer les performances diagnostiques de deux BU, Multistix 8SG® et Combur®, cette dernière n'ayant pas encore été testée à cette époque.



## **Elaboration de la recherche**

Nous avons recueillis les données de 100 paracentèses (dont 69 réalisées en ambulatoire) chez 31 patients atteints pour 30 d'entre eux d'une cirrhose alcoolique. Aucun patient n'avait d'antécédent d'ISLA, n'était infecté par le VIH, n'était atteint de péritonite secondaire ou ne recevait de traitement corticoïde ou immunosuppresseur. La technique de référence pour le diagnostic d'ISLA était l'examen cytologique du liquide d'ascite. Les BU avaient une échelle colorimétrique différente avec différents grades selon le nombre de polynucléaires neutrophiles (PNN): 5 grades pour la BU Multistix<sup>®</sup> (grade 0 : 0 PNN/mL ; grade 1 : 15 PNN/mL ; grade 2 : 70 PNN/mL ; grade 3 : 125 PNN/mL ; grade 4 : 500 PNN/mL) et 4 grades pour la BU Combur<sup>®</sup> (grade 0 : 0 PNN/mL ; grade 1 : 25 PNN/mL ; grade 2 : 75 PNN/mL ; grade 3 : 500 PNN/mL) avec une corrélation entre chaque grade et le nombre de PNN. Nous avons considéré qu'une couleur de BU virant au violet (correspond aux grades 3 ou 4 pour la BU Multistix<sup>®</sup> et aux grades 2 et 3 pour la BU Combur<sup>®</sup>) était positives.

En prenant des seuils bas de PNN (125 PNN pour la BU Multistix 8SG<sup>®</sup> et 75 PNN pour la BU Combur<sup>®</sup>) pour le diagnostic d'ISLA, nous espérons détecter plus facilement les ISLA liées à des cocci Gram positifs [69]. Lorsque la BU était positive, une autre bandelette était testée. Trois situations pathologiques ont pu être définies : 1) la péritonite bactérienne spontanée lorsque le compte de PNN dans l'ascite était  $> 250 /\text{mm}^3$  avec une culture positive ; 2) la neutroascite lorsque le compte de PNN dans l'ascite était  $> 250 /\text{mm}^3$  avec une culture négative en l'absence de prise d'antibiotique ; 3) la bactériascite lorsque le compte de PNN dans l'ascite était  $< 250 /\text{mm}^3$  avec une culture positive en l'absence de foyer infectieux intra-abdominal chirurgical.

## **Analyse statistique**

Pour analyser les performances intrinsèques des BU testées, nous avons recherché leur sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP) et négative (VPN).

## **Résultats**

Nous avons observé 9 cas d'infection d'ascite correspondant à 4 péritonites spontanées et 5 neutroascites dont une était une récurrence. Huit de ces infections étaient symptomatiques à l'admission du malade. Une seule de ces ascites infectées concernait un patient ambulatoire, soit une prévalence d'infection de 1,4% pour l'ensemble des ponctions faites en ambulatoire. Les patients ont reçu une antibiothérapie par Augmentin<sup>®</sup> avec un

contrôle de l'ascite à 48 heures. L'évolution a été favorable sauf pour un patient qui est décédé d'un coma encéphalopathique. Au seuil de 250 PNN/mm<sup>3</sup>, les deux BU affichaient exactement les mêmes performances : une sensibilité à 89%, une spécificité à 100%, une VPP à 100% et une VPN à 99%.

### **Conclusion.**

Cette étude confirmait les bons résultats des BU pour le diagnostic d'ISLA affichés par d'autres équipes (**tableau 4** de l'article). Pour expliquer notre unique faux négatif (une infection mal classée), nous avons pensé que le temps d'immersion de la BU dans l'ascite et l'intervalle de temps écoulé jusqu'à la lecture colorimétrique de la BU étaient trop courts mais cela n'a pas été analysé davantage. L'intérêt majeur de l'utilisation de la BU était un diagnostic rapide à toute heure de la journée permettant l'administration immédiate des antibiotiques, surtout lorsque l'ISLA n'était pas soupçonnée par la clinique. L'autre atout était économique puisque le prix d'une BU était de 0,4 € pour la BU Multistix 8SG<sup>®</sup> et de 0,29 € pour la BU Combur<sup>®</sup> comparativement à 53 € pour la cytologie classique. Cette étude avait toutefois été conduite sur un faible effectif, et ces résultats encourageants devaient être confirmés par une étude multicentrique de plus grande envergure avant d'être définitivement validés.

Toutefois cette étude recensait très peu d'ISLA (n=9) probablement en rapport avec le nombre important de ponction faite en ambulatoire (69%) ; en effet, la prévalence des ISLA chez les patients ambulatoires est faible, allant de 0% à 3,5% **[112, 151, 241]**, car les patients admis en hospitalisation ont en général une maladie hépatique plus sévère et la cause de l'hospitalisation est parfois un facteur de risque d'ISLA (l'hémorragie gastro-intestinale favorise les bactériémies). De plus, le nombre de paracentèse (n=100) analysée dans notre étude était modeste. Ces résultats méritaient une confirmation à plus grande échelle malgré la diffusion d'études affichant toutes d'excellentes performances des BU avec des sensibilités à 85-100% et des spécificités à 98-100% **[64, 73, 256, 290, 306]**.

### 3.3) Article 3

Nousbaum JB, Cadranel JF, Nahon P, Nguyen Khac E, Moreau R, **Thévenot T**, Silvain C, Bureau C, Nouel O, Pilette C, Paupard T, Vanbiervliet G, Oberti F, Davion T, Jouannaud V, Roche B, Bernard PH, Beaulieu S, Danne O, Thabut D, Chagneau-Derrode C, de Lédinghen V, Mathurin P, Pauwels A, Bronowicki JP, Habersetzer F, Abergel A, Audigier JC, Sapey T, Grangé JD, Tran A; Club Francophone pour l'Etude de l'Hypertension Portale; Association Nationale des Hépatogastroentérologues des Hôpitaux Généraux de France.

Diagnostic accuracy of the Multistix 8 SG<sup>®</sup> reagent  
strip in diagnosis of spontaneous bacterial  
peritonitis

*Hepatology* 2007;45:1275-81.



# Diagnostic Accuracy of the Multistix 8 SG Reagent Strip in Diagnosis of Spontaneous Bacterial Peritonitis

Jean-Baptiste Nouisbaum,<sup>1,\*</sup> Jean-François Cadranel,<sup>2,\*</sup> Pierre Nahon,<sup>3</sup> Eric Nguyen Khac,<sup>4</sup> Richard Moreau,<sup>5,29</sup> Thierry Thévenot,<sup>6</sup> Christine Silvain,<sup>7</sup> Christophe Bureau,<sup>8</sup> Olivier Nouel,<sup>9</sup> Christophe Pilette,<sup>10</sup> Thierry Paupard,<sup>11</sup> Geoffroy Vanbiervliet,<sup>12</sup> Frédéric Oberti,<sup>13</sup> Thierry Davion,<sup>14</sup> Vincent Jouannaud,<sup>2</sup> Bruno Roche,<sup>15</sup> Pierre-Henri Bernard,<sup>16</sup> Sandrine Beaulieu,<sup>17</sup> Odile Danne,<sup>18</sup> Dominique Thabut,<sup>19</sup> Carinne Chagneau-Derrode,<sup>7</sup> Victor de Lédinghen,<sup>20</sup> Philippe Mathurin,<sup>21</sup> Arnaud Pauwels,<sup>22</sup> Jean-Pierre Bronowicki,<sup>23</sup> François Habersetzer,<sup>24</sup> Armand Abergel,<sup>25</sup> Jean-Christian Audigier,<sup>26</sup> Thierry Sapey,<sup>27</sup> Jean-Didier Grangé,<sup>28</sup> Albert Tran,<sup>12</sup> Club Francophone pour l'Etude de l'Hypertension Portale, and Association Nationale des Hépatogastroentérologues des Hôpitaux Généraux de France

Recent studies have shown that the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis (SBP) can be rapidly obtained using leukocyte esterase reagent strips. However, published studies were restricted to one or two centers, and the number of patients with SBP was thus limited. The aims of the current prospective multicenter study were: (1) to assess the diagnostic accuracy of the Multistix 8SG urine test for the diagnosis of SBP; and (2) to assess the prevalence of SBP. From January to May 2004, 2 reactive strips were tested independently in inpatients with cirrhosis and in outpatients undergoing paracentesis. Cultures of ascitic fluid were performed at the bedside using aerobic and anaerobic blood culture bottles. Two thousand one hundred twenty-three paracenteses were performed in 1,041 patients from 70 centers. One hundred seventeen samples, obtained from 91 patients, had ascites polymorphonuclear cell (PMN) counts  $\geq 250/\mu\text{L}$  (range, 250–34,000), among which 56 were associated with positive ascitic fluid cultures. The prevalence of SBP was 5.5% in the whole population, 9% in inpatients, and 1.3% in outpatients ( $P < 0.0001$ ). The prevalence of SBP was 0.57% in asymptomatic outpatients versus 2.4% in symptomatic outpatients ( $P = 0.04$ ). Using a threshold of 2+ for positivity of the reagent strip, sensitivity was 45.3% for the diagnosis of SBP, specificity was 99.2%, positive predictive value was 77.9%, and negative predictive value was 96.9%. **Conclusion:** This study confirms the low prevalence of SBP in asymptomatic outpatients according to *a priori* defined criteria, and indicates an absence of diagnostic efficacy for this specific strip test. (HEPATOLOGY 2007;45:1275–1281.)

Spontaneous bacterial peritonitis (SBP) is a frequent and severe complication of cirrhosis.<sup>1–4</sup> The prognosis of SBP has been improved by the use of antibiotics with high peritoneal diffusion and low neph-

rotoxicity and by the prophylactic use of antibiotics in high-risk groups of patients.<sup>5</sup> This improvement in survival also might be explained by more rapid diagnosis and treatment, thereby avoiding the occurrence of severe sepsis and septic shock, a condition well known for its frequently fatal outcome.<sup>6</sup> The diagnosis of SBP is based on detection of a polymorphonuclear neutrophil count equal to or greater than  $250/\mu\text{L}$  with or without positive culture. However, obtaining an ascitic cell count within a few hours is sometimes difficult, and the clinician may decide to start an empiric antibiotic based on clinical or biological signs suggestive of infection.

Recently, the use of urinary reagent strips has been proposed for rapid diagnosis of SBP. The urinary strips identify leukocytes by detecting their esterase activity via a colorimetric reaction.<sup>7,8</sup>

The use of Multistix strips (Bayer Health Care) has been tested for the diagnosis of bacterial meningitis,<sup>9</sup> pleural infection,<sup>10</sup> synovial infection,<sup>11</sup> and peritoneal

Abbreviations: NPV, negative predictive value; PMN, polymorphonuclear cell count; PPV, positive predictive value; SBP, spontaneous bacterial peritonitis.

From the Services d'Hépatogastroentérologie de <sup>1</sup>Brest, <sup>2</sup>Creil, <sup>3</sup>Bondy, <sup>4</sup>Amiens, <sup>5</sup>Clichy, <sup>6</sup>Cambray, <sup>7</sup>Poitiers, <sup>8</sup>Toulouse Purpan, <sup>9</sup>Saint-Brieuc, <sup>10</sup>Le Mans, <sup>11</sup>Dunkerque, <sup>12</sup>Nice, <sup>13</sup>Angers, <sup>14</sup>Lens, <sup>15</sup>Villejuif, <sup>16</sup>Bordeaux Saint-André, <sup>17</sup>Poissy, <sup>18</sup>Pontoise, <sup>19</sup>Paris Pitié-Salpêtrière, <sup>20</sup>Bordeaux Pessac, <sup>21</sup>Lille, <sup>22</sup>Gonesse, <sup>23</sup>Nancy, <sup>24</sup>Strasbourg, <sup>25</sup>Clermont-Ferrand, <sup>26</sup>Saint-Etienne, <sup>27</sup>Châteaufort, <sup>28</sup>Paris Tenon, <sup>29</sup>INSERM, U773, Centre de Recherche Biomédicale Bichat-Beaujon CRB3, Hôpital Beaujon, Clichy, France.

\*The first two authors contributed equally.

Received May 13, 2007; accepted December 18, 2007.

Address reprint requests to: Professor Jean-Baptiste Nouisbaum, M.D., Ph.D., Service d'Hépatogastroentérologie, CHU La Cavale Blanche, 29609 Brest Cedex, France. E-mail: jean-baptiste.nouisbaum@chu-brest.fr; fax: (33)-2-98-05-342597.

Copyright © 2007 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.21588

Potential conflict of interest: Nothing to report.

infection in dialyzed patients.<sup>12-14</sup> For diagnosis of SBP, use of a reagent strip may be promising, because it has high sensitivity, between 85% and 100%, and high specificity, between 98% and 100%.<sup>15-19</sup>

However, published studies have been limited by the number of SBP episodes, and have been restricted to one or two centers.<sup>15-19</sup> The authors of those studies suggested validating this technique in a larger group of patients with cirrhosis in a multicenter study. Moreover, the prevalence of SBP depends on the studied population. Indeed, the prevalence of SBP is low in ambulatory asymptomatic patients in whom therapeutic paracenteses are performed for refractory ascites.<sup>20-22</sup> Thus, the accuracy of the test should be evaluated according to the different subgroups of patients.

The aims of this large prospective multicenter study were: (1) to assess the diagnostic accuracy of the Multistix 8 SG urinary screening test for the diagnosis of SBP in patients admitted for complications of cirrhosis or for therapeutic paracentesis as outpatients; and (2) to assess the prevalence of SBP in a multicenter prospective study in inpatients with cirrhosis with ascites and in outpatients with cirrhosis treated by therapeutic paracentesis for refractory ascites.

## Patients and Methods

**Patients.** The study prospectively involved all consecutive patients with cirrhosis admitted between January and May 2004 to the 70 participating centers under the authority of the "Club Francophone pour l'Etude de l'Hypertension Portale" and the "Association Nationale des Hépatogastroentérologues des Hôpitaux Généraux de France." Centers affiliated with the Club Francophone pour l'Etude de l'Hypertension Portale were academic hospitals and centers affiliated with the Association Nationale des Hépatogastroentérologues des Hôpitaux Généraux de France were primary referral hospitals.

Diagnosis of cirrhosis relied on clinical, biological, and morphological criteria. Patients were admitted either for treatment of ascites or for complications of cirrhosis (i.e., infection, gastrointestinal bleeding, hepatic encephalopathy, alcoholic hepatitis, acute renal failure, hepatocellular carcinoma), or were treated in an ambulatory setting. These outpatients were also included consecutively whether they presented with or without signs of SBP. Patients were defined as "symptomatic" according to the following criteria<sup>20</sup>: temperature above 38°C or below 36.5°C, chills, abdominal tenderness suggestive of peritonitis, developing or worsening hepatic encephalopathy, gastrointestinal bleeding within the last 15 days, acute renal failure (defined by an increase in the serum creati-

nine level to above 133  $\mu\text{mol/L}$ ), or arterial hypotension (systolic arterial pressure below 80 mm Hg). These signs suggestive of infection were carefully searched for at admission by a senior physician. Exclusion criteria were: chylous ascites and ascites not related to portal hypertension (i.e., pancreatic ascites, peritoneal tuberculosis, peritoneal carcinomatosis). Patients with hemoperitoneum complicating hepatocellular carcinoma were also excluded.

The following data were recorded: age, sex, cause of cirrhosis (alcoholic, HBV, HCV, genetic hemochromatosis, other), the existence or not of prophylactic treatment by antibiotics, temperature, chills, systolic arterial pressure, abdominal pain suggestive of SBP, complications of cirrhosis, serum creatinine, prothrombin time, serum total bilirubin, serum albumin and platelet count, Child-Pugh score and grade.

**Paracentesis.** Ascitic fluid was examined for leukocyte counts and polymorphonuclear cell (PMN) counts/ $\mu\text{L}$ , total protein, and bacteriological status. Ascitic fluid was centrifuged at 2500g for 10 minutes. A smear was stained with Giemsa. Total and differential cell counts were made with an optical microscope. Bacterial cultures were obtained by bedside inoculation of 10 ml of ascitic fluid into aerobic and anaerobic bottles (BacT/ALERT, Biomérieux, France).<sup>23</sup>

Each sample of the ascitic fluid was tested using Multistix 8 SG according to the technique described for urine by the manufacturer (Bayer Pharma SAS, Puteaux, France). All reagent areas were immersed in ascitic fluid, and the strip was removed immediately. At 120 seconds, the color of the leukocyte reagent was compared with the color chart on the bottle. A correlation between leukocytes and the colorimetric 5-grade scale (from 0 to 4) was suggested by the manufacturer as follows: grade 0, 0 leukocytes/ $\mu\text{L}$ ; grade 1 (traces), 15 leukocytes/ $\mu\text{L}$ ; grade 2 (1+), 70 leukocytes/ $\mu\text{L}$ ; grade 3 (2+), 125 leukocytes/ $\mu\text{L}$ ; grade 4 (3+), 500 leukocytes/ $\mu\text{L}$ .

The strip was considered positive at grade 3 (125 leukocytes/ml), because grade 4 is above the cutoff defining SBP. Moreover, most patients with SBP caused by Gram-positive cocci have a PMN count below the threshold of 250/ $\mu\text{L}$ .<sup>24</sup>

The strips were tested independently by each investigator and by a nurse, both of whom were unaware of the results of ascitic cytological examination at the time of reading.

All strips were read manually; in some cases, strips were read using an automatic reader (Clinitek 50, Bayer Diagnostics) in centers in which this automatic reader was available. When there was discordance between the 2 readers, the highest value was registered. For each patient,



a test was repeated during the 5-month period of the study for a maximum of eight paracenteses.

The study protocol was approved by the local ethics committee of the University Hospital of Brest, France.

**Statistical Analysis.** Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. For variables that were not normally distributed, median and ranges are given. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), accuracy and likelihood ratios of each reagent strip in the diagnosis of SBP were calculated. Likelihood ratios were calculated as follows: likelihood ratio for a positive test result (LR+) = sensitivity/(1 - specificity); likelihood ratio for a negative test result (LR-) = (1 - sensitivity)/specificity. A 95% confidence interval for each statistic was calculated from binomial distribution.

Concordance between readings by the investigator and the nurse was evaluated using kappa statistics.

## Results

A total of 2,123 paracenteses were performed on 1,041 patients from 70 centers. Cirrhosis was mainly due to alcohol alone in 80.6% ( $n = 840$ ) of the cases. Cirrhosis was related to alcoholism and chronic hepatitis B or C in 5% of cases, and to chronic viral hepatitis alone in 8.5% of cases. The main characteristics of patients are shown in Table 1. The median number of paracenteses per patient was 2.0 (range, 1-8). Seven hundred forty-eight patients (71.9%) were male and 293 (28.1%) were female. Mean age was 60 years  $\pm$  11.5 (range, 25-93).

A total of 238 samples were collected in inpatients and outpatients receiving primary or secondary prophylaxis

**Table 1. Characteristics of the 1041 Patients Who Underwent Diagnostic or Therapeutic Paracentesis**

Characteristics	Value
Male sex, n (%)	748 (71.9)
Age (years), mean (range)	60 (25-93)
Median number of paracenteses	2
Cause of cirrhosis, n (%)	
Alcohol	840 (80.7)
Alcohol + viral hepatitis (B or C)	52 (5)
Viral hepatitis	88 (8.4)
Hemochromatosis	6 (0.6)
Others	55 (5.3)
Child-Pugh score, n (%)	
A	(0)
B	470 (45.2)
C	571 (54.8)
Prothrombin time (%), median (range)	52 (20-85)
Serum bilirubin ( $\mu$ mol/l), median (range)	30 (10-812)
Albumin (g/l), median (range)	29 (16.5-53)
Platelet count ( $10^9$ /l), median (range)	130 (15-684)
Serum creatinine ( $\mu$ mol/l), median (range)	80 (22-474)

**Table 2. Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value, Negative Predictive Value, and Likelihood Ratios of the Multistix 8 SG Reagent Strip in the Diagnosis of Spontaneous Bacterial Peritonitis**

Characteristic	Total Population (Number of Episodes)	Symptomatic Patients (Inpatients or Outpatients)
Number of SBP	117	104
True-positive (n)	53	50
True-negative (n)	1991	865
False-positive (n)	15	12
False-negative (n)	64	54
Sensitivity (%) (95% CI)	45.3 (36.6-54.3)	48.1 (38.7-57.6)
Specificity (%) (95% CI)	99.2 (98.8-99.6)	98.6 (97.6-99.2)
Positive predictive value (%) (95% CI)	77.9 (68.1-87.8)	80.6 (70.8-90.5)
Negative predictive value (%) (95% CI)	96.9 (96.1-97.6)	94.1 (92.6-95.6)
Positive likelihood ratio (95% CI)	60.6 (35.2-100)	35.1 (19.4-63.8)
Negative likelihood ratio (95% CI)	55.1 (46.7-65.0)	52.6 (43.7-63.3)

Abbreviation: SBP, spontaneous bacterial peritonitis.

with norfloxacin, and 351 samples in patients receiving other antibiotics for presumptive or documented bacterial infection.

A total of 1,147 samples were obtained from 686 inpatients and 976 samples from 355 outpatients; 581 patients (262 outpatients, 319 inpatients) were "asymptomatic" according to the following criteria (cf. supra): temperature above 38°C or below 36.5°C, chills, abdominal tenderness suggestive of peritonitis, developing or worsening hepatic encephalopathy, gastrointestinal bleeding within the last 15 days, acute renal failure, or arterial hypotension (systolic arterial pressure below 80 mm Hg). A total of 460 patients were defined as "symptomatic" when one or more criteria were noted. The prevalence of each specific symptom was as follows: fever > 38°C or hypothermia below 36.5°C ( $n = 317$ ), chills ( $n = 54$ ), abdominal tenderness ( $n = 130$ ), hepatic encephalopathy ( $n = 177$ ), gastrointestinal bleeding ( $n = 140$ ), acute renal failure ( $n = 147$ ), and arterial hypotension ( $n = 41$ ).

A total of 117 samples obtained from 91 patients had SBP. The PMN count ranged from 250/ $\mu$ l to 34,000/ $\mu$ l. The PMN count was below 1,000/ $\mu$ l in 50 samples.

These 117 SBP cases were associated with positive ascitic fluid cultures in 56 cases (47.9%).

Table 2 shows the sensitivity, specificity, PPV, NPV, likelihood ratio for a positive test, likelihood ratio for a negative test, and 95% CI when we considered a reagent strip positive with grade 3.

Briefly, in the overall population, sensitivity was 45.3%, specificity 99.2%, PPV 77.9%, and NPV 96.9%.

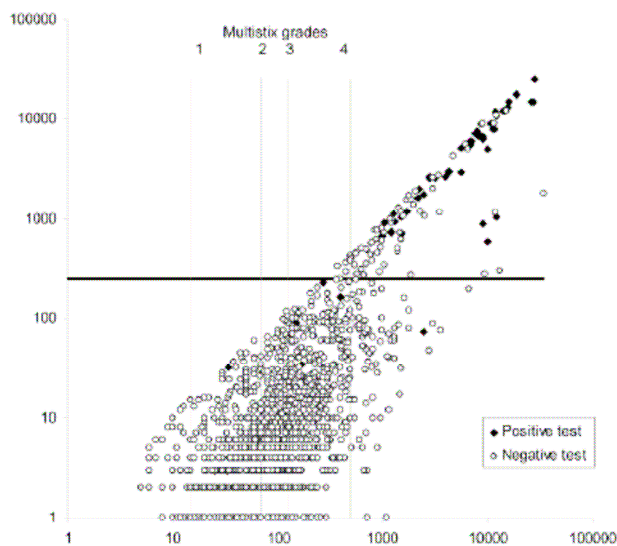


Fig. 1. Correlation between ascites total leukocyte count (x-axis) and ascites polymorphonuclear count (y-axis) (Spearman  $\rho = 0.719$ ). Multistix 8 SG grades: grade 0, 0 leukocytes/ $\mu\text{L}$ ; grade 1, 15 leukocytes/ $\mu\text{L}$ ; grade 2, 70 leukocytes/ $\mu\text{L}$ ; grade 3, 125 leukocytes/ $\mu\text{L}$ ; grade 4, 500 leukocytes/ $\mu\text{L}$ .

When considering symptomatic patients, whether inpatients or outpatients, sensitivity was 48.1%, specificity was 98.6%, PPV was 80.6%, and NPV was 94.1%. For inpatients without *a priori* clinical or biological signs of infection,<sup>20</sup> sensitivity fell to 16.7%, specificity was 99.2%, PPV only 33.3%, and NPV 98.0%. Considering asymptomatic outpatients, sensitivity was 25%, specificity 100%, PPV 100%, and NPV 99.6%.

Exact concordance between the 2 readers (a doctor and a nurse) was high ( $K = 0.805$ ;  $P < 0.0001$ ). A strong correlation was seen between ascitic fluid total leukocyte count and PMN (Fig. 1). Three hundred sixteen samples were read using an automatic reader. In 18 samples, the PMN count was above 250/ $\mu\text{L}$ . The correlation between ascitic leukocyte count and results obtained by automatic reading was good (Spearman  $\rho$ : 0.719;  $P < 0.0001$ ). The diagnostic performances of the test according to the different subgroups of patients are shown in Table 2.

The prevalence of SBP using cell count (i.e.,  $\text{PMN} \geq 250/\mu\text{L}$ ) was 9% in inpatients and 1.33% in outpatients, including patients with a previous diagnosis of SBP and patients on antibiotics. In the ambulatory setting, the prevalence of SBP was 0.57% in asymptomatic outpatients. The prevalence of SBP in these different settings was higher in patients with a previous diagnosis of SBP (data not shown). Among 4 patients who had an absolute neutrophil count of  $\geq 250/\mu\text{L}$ , one was detected positive with 3,000 PMN/ $\mu\text{L}$  and a positive culture for *Streptococcus*. For the other three patients, the strip was negative

with 1290, 308, and 504 neutrophils/ $\mu\text{L}$ , respectively. Culture of ascitic fluid was negative in all cases. One patient received empiric antibiotic therapy. The other 2 patients did not take the antibiotics prescribed, and they were seen 1 and 2 months later without any symptoms.

## Discussion

Our study confirms that the specificity of reagent strips is very high in the diagnosis of SBP. However, the sensitivity of the Multistix 8 SG test was low in this large national multicenter prospective study involving patients with cirrhosis followed both in academic hospitals and in primary referral hospitals.

Using the threshold of 125 leukocytes/ $\mu\text{L}$ , sensitivity was only 45.3%, which is much lower than the sensitivity reported in previous studies.<sup>15-19</sup> Moreover, the cutoff of the strip that we defined for detection of SBP was low: indeed, the next grade of the Multistix strip corresponded to 500 leukocytes/ $\mu\text{L}$ .

Several explanations are possible for this poor sensitivity. First, published studies were limited to a small number of patients with SBP. According to the 95% CI, in a larger population of patients with SBP, there might be a high rate of false-negative tests.<sup>19</sup> Moreover, those studies were limited to one or two centers, making extrapolation to real-life situations difficult.<sup>18,19</sup> In the study performed by Butani et al.,<sup>15</sup> two samples for which the leukocyte esterase test were negative had the 2 lowest absolute PMN values, 1088 and 368 PMN/ $\mu\text{L}$ , respectively. The authors suggested lower sensitivity of the test in a weakly positive setting. In our study, the larger number of samples with low PMN values below 1000/ $\mu\text{L}$  may account for the lower sensitivity reported thus far.

Second, the strip was initially designed for detection of urinary tract infections in which the number of leukocytes is significantly higher than in SBP. In initial reports, the sensitivity of the reagent strips ranged from 85% to 100%. The sensitivity of the test may vary according to the setting. Meta-analysis showed that the sensitivity of leukocyte esterase tests in the diagnosis of urinary tract infections ranged from 56% in an emergency setting to 87% for the family physician.<sup>25</sup> Even in this situation, when the strip is negative and there is a high probability of urinary infection, the clinician relies on clinical signs. In the case of SBP, infection is associated with high morbidity and a high mortality rate. Therefore, delaying the start of antibiotics based on a negative result of the test would be deleterious. The strip may be helpful for the clinician when the test is positive, as the specificity of the test is very high. Indeed, in our study, specificity was 99.2%. Conversely, a negative result cannot exclude the diagnosis of



**Table 3. Sensitivity, Specificity, Positive Predictive Value, and Negative Predictive Value in Published Studies on the Diagnosis of SBP Using Different Reagent Strips**

Study, First Author (Ref.)	Year	N	No. SBP	Reagent Strip	Se (%)	Sp (%)	PPV (%)	NPV (%)
Vanbiervliet et al. <sup>16</sup>	2002	72	9	Multistix 8 SG	100	100	100	100
Castellote et al. <sup>17</sup>	2003	228	52	Aution sticks	89	99	98	97
Butani et al. <sup>15</sup>	2004	136	12	Multistix 10 SG	83	99	91	98
Sapey et al. <sup>19</sup>	2004	245	17	Nephur test	88.2	99.6	93.8	99.1
		245	17	Multistix 8 SG	64.7	99.6	91.7	97.4
Thévenot et al. <sup>18</sup>	2004	100	9	Multistix 8 SG	89	100	100	99
Campillo et al. <sup>26</sup>	2006	443	46	Multistix	69.6	94.9	64	96
				Combur	80.4	90.4	52	97.3
Present study	2006	2123	117	Multistix 8 SG	45.3	99.2	77.9	96.9

Abbreviation: SBP, spontaneous bacterial peritonitis.

SBP, particularly in symptomatic patients, in whom sensitivity was only 48.1%.

We chose to use the Multistix 8 SG in this study for several reasons: previous studies had shown its excellent sensitivity,<sup>15,16</sup> and this test is widely available in public institutions in France. Nonetheless, other reagent strips can be used with greater accuracy. Castellote et al.<sup>17</sup> used Aution sticks manufactured in Italy and observed 89% sensitivity. However, in that study, some patients had ascites unrelated to portal hypertension, that is, carcinomatous ascites with a high ascitic leukocyte count. To our knowledge, no study had yet compared Aution sticks and Multistix 8 SG strips. Sapey et al.<sup>19</sup> compared the Multistix 10 SG and the Nephur test and showed that the Nephur test was more sensitive (88.2% vs 64.7%). The Combur test, which is a modified version of the Nephur test, has also been recently compared with the Multistix in 2 studies.<sup>18,26</sup> The sensitivity of the tests was identical in the first study,<sup>19</sup> whereas the Combur test was more sensitive than the Multistix test in the second when using the threshold of grade 2 on a colorimetric scale (63.0 versus 45.7%).<sup>26</sup> Our results are in accordance with the latter study. Indeed, we defined the threshold of positivity with grade 3 of the test (125 PMN/ $\mu$ l). The sensitivity of the test was much higher when using grade 2 or grade 1 (data not shown), but specificity decreased slightly. Results of diagnostic performances in the main published studies including ours are presented in Table 3. Thus, some tests probably outperform Multistix 8 SG. Other strips should be tested and developed.

However, in terms of the severity of SBP, the rate of false-negative results remains high. These tests may help the clinician in some circumstances when a cell count is not available within a few hours. Reagent strips may be useful in developing countries without sufficient resources. The cost of the strip is only 0.15 euros. Our results do not support systematic replacement of standard ascitic fluid analyses by the use of reagent strips at this time.

Although the concordance between the investigator and the nurse was excellent, it was not total. We suggest performing 2 tests to increase sensitivity, because interpretation of the test may depend on the reader and on environmental factors such as room lighting. We expected that automatic reading would increase the performance of the test. Unfortunately, we did not observe greater accuracy with the automatic reader. A few false-negative results were observed with automatic reading in patients with SBP and a positive strip, as noted by the investigator.

Our study confirms the low prevalence of SBP in asymptomatic outpatients (0.57%) in a population chosen based on previously well-defined clinical criteria.<sup>20-22</sup> In three previous studies with a number of paracenteses ranging from 117 to 427, the prevalence of SBP was low (0%-3.5%).<sup>20,21</sup> In addition, Runyon<sup>27</sup> recently reported a 2% prevalence of SBP in a series of 400 paracenteses performed in 2 years in an outpatient setting. The results of the present study are comparable to those reported by Evans et al.<sup>21</sup> and by Romney et al.<sup>22</sup> In their retrospective study of 427 patients with cirrhosis seen in a single outpatient clinic, Evans et al.<sup>21</sup> analyzed 427 exploratory paracenteses performed over a 6-year period. Their exclusion criteria were similar to those used by Jeffries et al.,<sup>20</sup> but patients receiving primary or secondary prophylaxis with norfloxacin were excluded. For Evans et al.,<sup>27</sup> the prevalence of SBP was 1.4% and the prevalence of neutrocytic ascites was 2.1% (giving a combined prevalence of 3.5%). In the prospective multicenter study of Romney et al.,<sup>22</sup> the prevalence of SBP was nil. The results of these different studies in outpatients without suspected infection are thus similar, with a prevalence of SBP varying from 0 to 3.5% (Table 4). The higher prevalence of SBP was reported by Evans et al.<sup>21</sup> and could be explained by less restrictive *a posteriori* exclusion criteria and possible inclusion of infected patients. Moreover, in the study by Evans et al., patients receiving norfloxacin were not included. In our multicenter prospective study, the prev-

**Table 4. Prevalence of SBP in Asymptomatic Outpatients**

Study, First Author (Reference)	Number of Patients	Number of Paracenteses	Prevalence of Bacterial Peritonitis, n (%)
Jeffries <sup>20</sup>	29	118	0 (0)
Evans <sup>27</sup>	427	427	15 (3.5)
Romney <sup>22</sup>	67	270	0 (0)
Present study	337	701	4 (0.57)

alence of SBP in asymptomatic outpatients was 0.57%, confirming a very low prevalence of SBP in this setting.

In summary, our study confirms the excellent specificity of Multistix 8 SG strips in the diagnosis of SBP, but reveals the poor sensitivity and positive predictive value of the test.

Therefore, it should not systematically replace standard ascitic fluid analyses because of its weak sensitivity and because it cannot rule out SBP. Other reagent strips may be more accurate but still lack sensitivity. Routine cytological examination remains mandatory for the diagnosis of SBP.

**Acknowledgment:** We thank LFB Laboratories (Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, France) for their support, Dr. Christophe Bessaguet for statistical help, and Jerri Bram for revision of the manuscript.

## Appendix

### Participating Clinical Centers

Abbeville: J. Butel, Aix en Provence: C. Wartelle, M. Picon, J. Lafon; Amiens: D. Capron, E. Nguyen-Khac; Angers: F. Oberti, P. Cales; Arles: G. Boulay; Aulnay sous Bois: G. Bellaïche, J.L. Slama; Auxerre: B. Champigneulle; Avignon: J.P. Arpurt, Dr. Bellon, Dr. Bramli, Dr. Coulibaly; Besançon: S. Bresson-Hadni, C. Vanlemmens, V. Di Martino, J.P. Miguet; Bondy: P. Nahon, N. Ganne-Carrié, J.C. Trinchet, M. Beaugrand; Bordeaux Pessac: X. Adhoute, V. De Lédighen, P. Couzigou; Bordeaux Saint André: P.H. Bernard, C. Balabaud; Bourg en Bresse: D. Pillon; Brest: J.B. Nousbaum, F. Cholet, H. Gouérou; Cambrai: T. Thévenot; Chalons en Champagne: N. Abdelli; Chalons sur Saône: P. Bernard, A. Soupison; Chambéry: F. Bourrhis, M. Jegou; Châteauroux: T. Sapey, E. Fort; Cherbourg: H. Bertrand; Clermont-Ferrand: A. Abergel, C. Bonny; Clichy: R. Moreau, D. Lebre, F. Durand, F. Degos, D. Valla; Clichy (Gouin): S. Levy, C. Halimi; Creil: J.F. Cadranel, V. Jouannaud, P. Lemaitre, D. Belloula, N.E. Farouj; Dunkerque: T. Paupard, Dr. Belhous; Eaubonne: M. Howaizi; Evry-Corbeil: B. Wisniewski, D. Labayle, D. Fischer, J. Dennis; Foix: J.M. Dramard; Fourmies: P. Bohon; Gonesse: A. Pauwels, A. Medini; Jolimont: J. Henrion; Le Kremlin Bicêtre: M. Gelu-Siméon, G. Pelletier, C. Buffet; Le Mans: C. Pilette, B. Bour, A. Bianchi; Lens: T. Davion, C. Becker, Dr. Touze, Dr. Djédid; Lille: P. Mathurin, V. Canva-Delcambre, J.C. Paris; Lomme: D. Lucidarme, B. Filoche; Lourdes: J.J. Meurisse; Marseille Conception: D. Botta-Fridlund; Marseille Saint-Joseph: P. Castellani, M. Bourlière; Metz: J.J. Raabe, J.M. Perarnau; Montargis: Dr. Blondon; Montauban: J.L. Payen, L. Escudé; Montélimar: B. Nalet, F. Belouineau; Montfermeil: B. Lesgourgues, S. Nahon; Morlaix: A. Gourlaouen, P. Loudy; Nancy: D. Ancel, J.P. Bronowicki; Narbonne: E. Vaucher, L. Billès; Nice: G. Vanbiervliet, A. Tran; Paris (Pitié Salpêtrière): D. Thabut, T. Poynard; Paris Saint

Antoine: N. Carbonnel, L. Serfaty, T. Andréani, O. Chazouillères, R. Poupon, A. Poujol-Robert; Paris Tenon: X. Amiot, J.D. Grangé; Pau: A. Pariente; Ploermel: M. Besseau, J.M. Rotty; Poissy: R.L. Vité, C. Eugène, S. Beaulieu; Poitiers: C. Silvain, C. Chagneau, M. Beauchant; Pontivy: J.A. Seyrig, J. Abdulhadi; Pontoise: O. Danne, P. Hervio; Saint Brieuc: O. Nouel; Saint Denis: H. Labadie, P. Periac; Saint Etienne: J.C. Audigier; Sarrebourg: H. Jouin; Senlis: A. Menzel; Strasbourg: F. Habersetzer, D. Vetter, M. Doffoel, Dr. Ananna; Tarbes: T. Morin, I. Kamran; Toulouse Purpan 1: C. Bureau, J.M. Peron, K. Barange, J.P. Vinel; Toulouse Purpan 2: L. Alric, M. Duffaut, S. Thebault; Valenciennes: A. Boruchowicz; Vannes: D. Grasset; Villejuif: B. Roche, J.C. Duclos-Vallée, D. Samuel; Villeneuve Saint Georges: L. Bettan.

## References

- Such J, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. Clin Infect Dis 1998;27:669-674; quiz 675-6.
- Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, et al. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. J Hepatol 2000; 32:142-153.
- Garcia-Tsao G. Current management of the complications of cirrhosis and portal hypertension: variceal hemorrhage, ascites, and spontaneous bacterial peritonitis. Gastroenterology 2001;120:726-748.
- Wong F, Bernardi M, Balk R, Christman B, Moreau R, Garcia-Tsao G, et al. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. Gut 2005;54:718-725.
- Bernard B, Grange JD, Khac EN, Amiot X, Opolon P, Poynard T. Antibiotic prophylaxis for the prevention of bacterial infections in cirrhotic patients with gastrointestinal bleeding: a meta-analysis. HEPATOLOGY 1999;29:1655-1661.
- Moreau R, Hadengue A, Soupison T, Kirstetter P, Mamzer MF, Vanjak D, et al. Septic shock in patients with cirrhosis: hemodynamic and metabolic characteristics and intensive care unit outcome. Crit Care Med 1992;20: 746-750.
- Levy M, Tournot F, Muller C, Carbon C, Yeni P. Evaluation of screening tests for urinary infection in hospital patients. Lancet 1989;12:384-385.
- Hiscoke C, Yoxall H, Greig D, Lightfoot NF. Validation of a method for the rapid diagnosis of urinary tract infection suitable for use in general practice. Br J Gen Pract 1990;40:403-405.
- Moosa AA, Quorum HA, Ibrahim MD. Rapid diagnosis of bacterial meningitis with reagent strips. Lancet 1995;345:1290-1291.
- Azoulay E, Fartoukh M, Galliot R, Baud F, Simonneau G, Le Gall JR, et al. Rapid diagnosis of infectious pleural effusions by use of reagent strips. Clin Infect Dis 2000;31:914-919.
- Ravaud P, Hudry C, Giraudeau B, Weill B, Dougados M. Rapid diagnosis of inflammatory synovial fluid with reagent strips. Rheumatology (Oxford) 2002;41:815-818.
- Lopez Paredes A, Valera Morton C, Rodenas Garcia V, Pedromingo Marino A, Martinez Hernandez P. [The leukocyte zone on Multistix-10-SG reactive strips for cerebrospinal, seminal and peritoneal fluids]. Med Clin (Barc) 1988;90:362-365.
- Farmer CK, Hobbs H, Mann S, Newall RG, Ndawula E, Mihir G, et al. Leukocyte esterase reagent strips for early detection of peritonitis in patients on peritoneal dialysis. Perit Dial Int 2000;20:237-239.
- Sam R, Sahani M, Ulozas E, Leehey DJ, Ing TS, Gandhi VC. Utility of a peritoneal dialysis leukocyte test strip in the diagnosis of peritonitis. Artif Organs 2002;26:546-548.
- Butani RC, Shaffer RT, Szyjowski RD, Weeks BE, Speights LG, Kadakia SC. Rapid diagnosis of infected ascitic fluid using leukocyte esterase dipstick testing. Am J Gastroenterol 2004;99:532-537.
- Vanbiervliet G, Rakotoarisoa C, Filippi J, Guerin O, Calle G, Hastier P, et al. Diagnostic accuracy of a rapid urine-screening test (Multistix8SG) in

- cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:1257-1260.
17. Castellote J, Lopez C, Gornals J, Tremosa G, Farina ER, Baliellas C, et al. Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by use of reagent strips. *HEPATOLOGY* 2003;37:893-896.
  18. Thevenot T, Cadranel JF, Nguyen-Khac E, Tilmant L, Tiry C, Welty S, et al. Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients by use of two reagent strips. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:579-583.
  19. Sapay T, Kabissa D, Fort E, Laurin C, Mendler MH. Instant diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis using leukocyte esterase reagent strips: Nephur-Test vs. MultistixSG. *Liver Int* 2005;25:343-348.
  20. Jeffries MA, Stern MA, Gunaratnam NT, Fontana RJ. Unsuspected infection is infrequent in asymptomatic outpatients with refractory ascites undergoing therapeutic paracentesis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2972-2976.
  21. Evans LT, Kim WR, Poterucha JJ, Kamath PS. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *HEPATOLOGY* 2003;37:897-901.
  22. Romney R, Mathurin P, Ganne-Carrie N, Halimi C, Medini A, Lemaitre P, et al. Usefulness of routine analysis of ascitic fluid at the time of therapeutic paracentesis in asymptomatic outpatients: results of a multicenter prospective study. *Gastroenterol Clin Biol* 2005;29:275-279.
  23. Runyon BA, Canawati HN, Akriviadis EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology* 1988;95:1351-1355.
  24. Campillo B, Richardet JP, Kheo T, Dupeyron C. Nosocomial spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in cirrhotic patients: impact of isolate type on prognosis and characteristics of infection. *Clin Infect Dis* 2002;35:1-10.
  25. Deville WL, Yzermans JC, van Duijn NP, Bezemer PD, van der Windt DA, Bouter LM. The urine dipstick test useful to rule out infections: a meta-analysis of the accuracy. *BMC Urol* 2004;4:4.
  26. Campillo B, Richardet JP, Dupeyron C. Diagnostic value of two reagent strips (Multistix 8 SG and Combur 2 LN) in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis and symptomatic bacterascites. *Gastroenterol Clin Biol* 2006;30:446-452.
  27. Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2004;39:841-856.
-

## **Position du problème**

Avant la conduite de cette étude, tous les résultats publiés sur l'intérêt des BU dans le diagnostic de l'ISLA, y compris ceux que j'avais publiés (**article 2** de cette thèse) affichaient des performances remarquables (sensibilités comprises entre 85 et 100%, spécificités comprises entre 98 et 100%) [64, 73, 256, 290, 306]. Cependant, ces études étaient monocentriques, concernaient des populations hétérogènes (en majorité composées de patients hospitalisés), et le nombre de paracentèses analysées dans chacune d'entre-elles restait modestes. Il était donc essentiel de valider prospectivement ces résultats à grande échelle, dans les conditions en apparence les plus défavorables, c'est-à-dire en considérant un maximum de patients ambulatoires chez lesquels la probabilité d'ISLA risquait d'être la plus faible. Dans de telles conditions, l'obtention d'une bonne valeur prédictive positive de la BU pour le diagnostic d'ISLA serait le garant d'une grande valeur diagnostique de ce procédé. L'objectif secondaire de l'étude était de comparer prospectivement la prévalence de l'ISLA chez les patients ambulatoires et hospitalisés.

## **Elaboration de la recherche**

Cette étude menée par le Pr Nousbaum (CHU de Brest) a réuni 70 centres entre janvier et mai 2004. J'étais l'investigateur du centre de Cambrai, petit CHG, qui a pourtant été le 6<sup>ème</sup> centre inclueur. Les ascites chyleuses et les ascites ne compliquant pas une hypertension portale étaient exclues. En cas d'ascite hémorragique ( $GR > 10000/mm^3$ ), l'interprétation de la cytologie devait être corrigée en retranchant 1 PNN pour 250 globules rouges présents dans l'ascite [237].

La BU Multistix 8 SG<sup>®</sup> était évaluée pour le diagnostic d'ISLA en prenant le grade 3 (125 PNN/mL) comme seuil de positivité. La méthode de référence pour le diagnostic d'ISLA restait la cytologie du liquide d'ascite ( $PNN > 250/mm^3$ ) réalisée systématiquement.

## **Analyse statistique**

L'analyse statistique étudiait les performances de la BU Multistix 8 SG<sup>®</sup> en calculant la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive (VPP) et négative (VPN), et les rapports de vraisemblance positive et négative.



## **Résultats**

La cirrhose était principalement d'origine alcoolique (80,6%) et elle concernait 72% d'hommes. Nous avons pu réunir 2123 paracentèses provenant de 1041 patients (1147 ascites chez 686 patients hospitalisés et 976 ascites chez 355 patients ambulatoires). Au total 117 ascites étaient infectées (104 patients étaient symptomatiques) et le compte de PNN allait de 250 à 34000/mm<sup>3</sup>. La culture de ces ISLA était positive dans 47,9% des cas. La prévalence de l'ISLA était de 9% chez les patients hospitalisés et de 1,33% chez les patients ambulatoires (0,57% si asymptomatique). Globalement, les performances de la BU étaient les suivantes : sensibilité à 45,3%, spécificité à 99,2%, VPP à 77,9% et VPN à 96,9%. Lorsqu'on ne considérait que les patients symptomatiques, la sensibilité de la BU était faible (48,1%) et ce chiffre chutait à 25% chez les patients ambulatoires asymptomatiques.

## **Commentaires et conclusions**

Ce travail a confirmé l'excellente spécificité de la BU pour le diagnostic d'ISLA mais a montré à l'inverse une mauvaise sensibilité (55% de faux négatifs) malgré l'utilisation d'un seuil (125 PNN/mm<sup>3</sup> correspondant au grade 3 de l'échelle colorimétrique de la BU) inférieur au seuil de référence utilisé pour le diagnostic cytologique. Ces mauvais résultats différaient radicalement de ceux affichés par les études antérieures. Le faible nombre de neutrophiles observé dans les ascites infectées (PNN < 1000 PNN/mm<sup>3</sup> dans 43% des ISLA de cette étude multicentrique) peut conduire à une chute de la sensibilité de la BU pour le diagnostic d'ISLA; cette donnée était retrouvée par Sapey et al. [256] observant que les 9 ISLA avec BU positive avaient un nombre de PNN supérieur aux 9 ISLA avec une BU négative (5580 vs 461/mm<sup>3</sup>; P=0,05). De même, la concentration de protéines dans l'ascite peut altérer la performance de la BU. Une étude allemande a observé une médiocre sensibilité de la BU Multistix 10SG® (Se=31%) et de la BU Combur® (Se=44%) sur 194 paracentèses (16 cas d'ISLA). Les faux négatifs de la BU avaient des concentrations de protéines dans l'ascite plus élevées que les vrais positifs (34 g/L vs 21 g/L pour la BU Multistix 10SG® et 38 g/L vs 20 g/L BU Combur®) [138]. Il ne faut pas perdre de vue que ces BU ont été conçues pour le diagnostic d'infection urinaire où le nombre de PNN est généralement plus élevé et la concentration protéidique dépasse rarement 1 g/L. Cependant, même dans les infections urinaires la sensibilité des BU reste faible dans le cadre de l'urgence (56% avec un IC95% : 41-75%) [99].

Ainsi, la BU est utile au clinicien si elle est positive car sa spécificité est excellente et permet de débiter sans attendre la culture de l'ascite une antibiothérapie probabiliste. Par

contre, la suspicion clinique d'une ISLA avec une BU négative ne devrait pas retarder le traitement antibiotique puisque même chez ces patients la sensibilité reste extrêmement faible (48%). La lecture automatisée de la BU n'apportait pas de gain sur la performance de la BU et nous observons aussi des faux négatifs de l'ISLA avec BU positive.

Nous confirmons ici la faible prévalence de l'ISLA chez les patients ambulatoires asymptomatiques (0,57%) en accord avec les chiffres de prévalence rapportés (0% à 3,5%) **[112, 151, 241]**. La prévalence la plus élevée (3,5%) concernait une série rétrospective de 427 paracentèses faites en ambulatoire sur une période de 6 ans. Les patients étaient exclus s'ils recevaient une antibioprophylaxie primaire ou secondaire. L'unique intérêt de la BU pourrait être de rassurer le clinicien chez un patient venant se faire ponctionner en hôpital de jour puisqu'en l'absence de symptômes orientant vers une ISLA, le fait d'avoir une BU « négative » peut raisonnablement éliminer le diagnostic d'ISLA compte tenu de la faible prévalence cette infection chez les patients ambulatoires.

En 2008, nous avons réalisé une revue systématique sur ce sujet et nous avons recensé 19 études comparant la cytologie à la BU pour le diagnostic d'ISLA **[212]**. Cette revue confirmait la grande hétérogénéité des études en terme d'inclusion du nombre de patients (n=31 à 1041), de prévalence de l'ISLA (7 à 23%), et de la définition d'une BU positive (le choix des grades pouvait varier d'un grade  $\geq 1$  ou  $\geq 3$ ). Parmi les cinq BU étudiées, c'est peut-être la BU Aution® qui présentait la plus grande sensibilité (89%) avec toutefois une limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% relativement faible (81%). La BU ne devrait cependant pas être utilisée chez le patient hospitalisé, car il présente souvent une altération plus marquée de sa fonction hépatique que le patient ambulatoire et donc un risque plus élevé d'ISLA.

Compte tenu de l'envergure de cette étude, ces résultats font actuellement référence et l'utilisation de la BU est totalement abandonnée dans la pratique clinique au profit du maintien d'un examen cytologique systématique de tout liquide d'ascite ponctionné. Malgré ces résultats décevants, l'engouement des médecins a perduré; en 2011, une mise au point recensait 26 publications sur ce sujet, dont 23 articles originaux **[163]**. Cet engouement pour l'utilisation de la BU dans le diagnostic rapide de l'ISLA faisant suite aux premières publications enthousiastes nous rappelle aussi les espoirs déçus quant à l'utilisation du pH dans l'ascite pour le diagnostic de l'ISLA **[257]**. L'intérêt pour l'utilisation des BU a été relancé par une équipe américaine qui a développé une nouvelle BU calibrée pour détecter un faible nombre de PNN dans l'ascite (250 PNN/mm<sup>3</sup>) ; les performances affichées par cette BU, testée sur 1304 échantillons, montraient une sensibilité à 100%, une spécificité à 57,9%, une VPP à 76,5% et une VPN à 100% **[195]**.

### **3.4) Article 4**

Cervoni JP, Thevenot T, Weil D, Muel E, Barbot O, Sheppard F, Monnet E, Di Martino V.

C-reactive protein predicts short-term mortality  
in patients with end-stage liver disease

Article soumis à la revue *Journal of Hepatology*.

## **Position du problème**

La prise en charge des patients cirrhotiques fait poser tôt ou tard la question de la transplantation hépatique, ce qui suppose, compte tenu des règles d'attribution des greffons actuellement en vigueur en France, de pouvoir discriminer avec le maximum de précision les patients les plus à risque de décès à court terme, qui sont prioritaires. Nous disposons pour cela de scores pronostiques (Child-Pugh et MELD) utilisés quotidiennement [78, 182]. Néanmoins, ces scores ne font que refléter le degré de l'insuffisance hépatique et ne rendent pas compte d'événements surajoutés, directement en cause dans l'apparition de défaillances d'organe. De ce fait, au-delà d'une certaine gravité de l'insuffisance hépatique, ils apparaissent insuffisants pour la prédiction du décès à court terme, et moins performants que les scores généralistes utilisés en réanimation, comme le score APACHE II ou le score SOFA. Parmi les événements capables d'influencer le pronostic à court terme figure le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS), particulièrement fréquent au cours de la cirrhose [74, 286], car favorisé par la translocation bactérienne [85], c'est-à-dire la migration de bactéries viables et/ou de fragments bactériens d'origine intestinale vers les ganglions lymphatiques mésentériques ou d'autres sites extra-intestinaux [325]. Le SRIS est défini par la présence d'au moins deux des signes cliniques ou biologiques suivants : température  $>38^{\circ}\text{C}$  ou  $<36^{\circ}\text{C}$ , fréquence cardiaque  $>90$  /min, fréquence respiratoire  $>20$ /min ou  $\text{PaCO}_2 <32\text{mmHg}$ , leucocytose  $>12000$  ou  $<4000/\text{mm}^3$  ou présence de plus de 10% de formes immatures circulantes [1]. Ce syndrome semble être l'événement clé pour le développement des défaillances d'organes, en particulier rénale, hémodynamique, neurologique, et respiratoire [265, 266, 286]. Le SRIS constitue un centre d'intérêt croissant de la littérature en hépatologie, mais un problème encore non résolu concerne le diagnostic de SRIS lui-même, qui repose sur des critères clinico-biologiques établis chez des patients indemnes de maladie du foie [1], et qui, malheureusement, peuvent être artificiellement modifiés par la cirrhose elle-même. Il nous paraissait indispensable d'identifier un marqueur d'inflammation systémique suffisamment fiable pour le diagnostic de SRIS et de tester sa valeur pronostique. C'est tout naturellement que nous nous sommes intéressés à la C-réactive protéine (CRP). La CRP est une protéine synthétisée à la phase aiguë de l'inflammation en réponse à l'interleukine-6 et est capable de discriminer la présence d'un SRIS ainsi que la mortalité dans différentes populations de patients non cirrhotiques [72, 76, 169]. Bien que synthétisée par le foie, l'augmentation de la CRP peut être observée aux stades avancés d'insuffisance hépatique [57, 224]. Nous avons montré au cours d'une étude pilote rétrospective qu'une valeur élevée de CRP était associée à un risque de mortalité indépendant du MELD : le risque relatif de mortalité était de 2,7 pour une valeur de CRP  $>27$  mg/L, et la valeur prédictive positive de décès à était supérieure à 90% pour une

valeur de CRP > 30 mg/L [34]. Nous avons souhaité confirmer prospectivement l'intérêt pronostique de la CRP chez les patients atteints de cirrhose sévère et tester la performance diagnostique de la CRP pour le diagnostic de SRIS, malgré les réserves qui concernent l'application des critères utilisés pour le diagnostic de référence de ce syndrome au cours de la cirrhose.

### **Elaboration de la recherche**

Nous avons suivis prospectivement tous les patients cirrhotiques sévères (Child-Pugh > 7) entre octobre 2008 et août 2010 hospitalisés dans notre service d'Hépatologie. Au total 158 variables ont été enregistrées (données démographiques, cause et histoire de la cirrhose, index de comorbidités, etc.)

### **Analyse statistique**

La performance de la CRP pour prédire le SRIS a été évaluée par l'aire sous la courbe ROC (AUROC) et le meilleur seuil discriminant les patients avec et sans SRIS était obtenu en utilisant l'indice de Youden. Les courbes de survie ont été construites avec la méthode de Kaplan-Meier et comparées par le test du log-rank (analyse univariée) et le modèle de Cox (analyse multivariée). La survie à 6 mois a été le critère de jugement principal et nous avons analysé spécifiquement le sous-groupe des patients gardant au bout de 15 jours d'hospitalisation une valeur de CRP supérieure au seuil discriminant le SRIS. Notre hypothèse était qu'une élévation persistante de la CRP était un indicateur pertinent d'une inflammation systémique évoluant pour son propre compte, supposée particulièrement délétère pour le pronostic [Malik, 2009 #332].

### **Résultats**

Au total, 175 patients cirrhotiques sévères ont été inclus : 125 hommes (73%) d'âge moyen de 58 ans, alcooliques en majorité (88%). Nous avons noté 68 infections bactériennes documentées (39%), 28 carcinomes hépatocellulaires (16%) et 47 patients avaient les critères du SRIS (27%). La CRP variait de 1 à 240 mg/L (médiane à 27 mg/L).

Une CRP initiale élevée était associée à la présence d'une infection, d'un SRIS, d'un carcinome hépatocellulaire, et à l'absence de bêta-bloquants (42 vs 21 mg/L ;  $p=0,0003$ ). La valeur de la CRP n'était pas corrélée à celle du MELD. L'AUROC de la CRP pour la

prédiction du SRIS était de 0,72 (IC95% : 0,61-0,79) avec un seuil discriminant à 29 mg/L (sensibilité à 74,5% et spécificité à 63,2%) (**cf. figure 1** de l'article).

Le suivi médian était de 163 jours (3 à 1580 jours) : 78 patients (44,8%) sont décédés dont 61 dans les 6 mois, et 17 patients ont été transplantés. Nous avons défini 3 groupes de patients selon le taux de CRP à J0 et à J15. Le groupe A (n=47) : CRP  $\geq$  29 mg/L à J0 et à J15 ; le groupe B (n=33) : CRP  $\geq$  29 mg/L à J0 et CRP < 29 mg/L à J15 ; le groupe C (n=88) : CRP < 29 mg/L à J0. La survie à 3 mois et à 6 mois était de 56,1% et 40,3%, 79,4% et 66,8%, et 79,4% et 75,3% dans les groupes A, B et C respectivement (**cf. figure 2** de l'article).

En analyse univariée, la mortalité à 6 mois était associée au carcinome hépatocellulaire, aux comorbidités évaluées par l'index de Charlson, aux lactates, au MELD, à la créatinine et à la CRP  $\geq$  29 mg/L à J0 (47% vs 25% de ceux qui décédaient ;  $p < 0,0001$ ). En analyse multivariée, la mortalité à 6 mois étaient prédite par le MELD (HR=1,04 ; IC95% :1,00-1,08), les comorbidités extra-hépatiques (HR=1,87 ; IC95% :1,04-3,36), le carcinome hépatocellulaire (HR=2,28 ; IC95% :1,17-4,42), et le groupe A (HR=2,25 ; IC95% :1,25-4,07).

## **Conclusion**

La CRP est un outil pronostique d'accès facile qui permet d'identifier les patients cirrhotiques à haut risque de décès à court terme avant qu'ils ne soient hospitalisés en réanimation. En effet, l'élévation de la CRP persistant plus de 15 jours constitue une situation à haut risque pronostique. Ces résultats originaux méritent d'être validés sur une cohorte indépendante, mais d'ores et déjà, notre équipe prévoit d'implémenter la CRP dans un nouveau score de MELD, et de démontrer la valeur pronostique d'un « MELD-CRP ».

### **3.5) Article 5**

**Thevenot T**, Borot S, Remy-Martin A, Sapin R, Penfornis A, Di Martino V, Monnet E.

Assessing adrenal function in cirrhotic patients: is  
there a reliable test ?

*Gastroenterol Clin Biol* 2009;33:584-8.



Disponible en ligne sur  
ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
EM|consulte  
www.em-consulte.com



## VIEW POINT

# Assessing adrenal function in cirrhotic patients: Is there a reliable test?

*Évaluation de la dysfonction surrénale chez les patients cirrhotiques :  
a-t-on un test fiable ?*

T. Thevenot<sup>a,1,\*</sup>, S. Borot<sup>b,1</sup>, A. Remy-Martin<sup>c,1</sup>, R. Sapin<sup>d,1</sup>,  
A. Penfornis<sup>b,1</sup>, V. Di Martino<sup>a,1</sup>, E. Monnet<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> Service d'hépatologie et de soins intensifs digestifs, hôpital Jean-Minjoz, boulevard Fleming, 25030 Besançon cedex, France

<sup>b</sup> Service d'endocrinologie-métabolisme et diabétologie-nutrition, hôpital Jean-Minjoz, 25030 Besançon cedex, France

<sup>c</sup> Service de biochimie hormonale, hôpital Jean-Minjoz, 25030 Besançon cedex, France

<sup>d</sup> Service d'exploration fonctionnelle par les isotopes, 1, place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg cedex, France

Available online 26 May 2009

## Introduction

Adrenal dysfunction is an uncommon clinical condition that can arise in critical conditions such as severe infections, trauma and after aggressive surgery. Cortisol is essential for regulating the impaired vasomotor tonus of blood vessels, influencing the distribution of bodily fluids and sensitizing catecholamine receptors. However, few studies have assessed adrenal function in the setting of liver disease [1–9]. Adrenal dysfunction has been reported in acute liver disease and in hemodynamically stable cirrhotic patients, and is found with an impressive frequency of 77% in cirrhotic patients with septic shock [6]. The mechanisms leading to adrenal dysfunction in cirrhosis are poorly understood, but could include structural damage to the adrenal gland due to hemorrhage or infarction, increased levels of proinflam-

matory cytokines and impaired synthesis of cholesterol, the preferred source of steroidogenic substrate in the adrenal gland. At rest and during stress, around 80% of circulating cortisol is derived from plasma cholesterol, with the remaining 20% synthesized in situ from acetate and other precursors [10]. Low apolipoprotein A-I/HDL levels in critically ill patients may be pathogenetically linked to the high incidence of adrenal dysfunction in such patients, as it has been demonstrated that low HDL-cholesterol levels are associated with an attenuated response to synacthen [11].

This putative new concept of hepatoadrenal syndrome is supported by the many similarities between sepsis and end-stage liver disease such as the presence of hyperdynamic circulatory failure, decreased systemic vascular resistance, increased cardiac output and overproduction of interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . However, no proof of this theory is currently available, and there are no randomized controlled trials showing beneficial effects of corticotherapy in this patient group. In addition, the management of adrenal dysfunction in sepsis or septic shock remains controversial: the CORTICUS study group found no improvement in mortality, and only a speedier

\* Corresponding author.

E-mail address: tthevenot@chu-besancon.fr (T. Thevenot).

<sup>1</sup> Members of the Corticir study group.



reversal of shock in patients receiving hydrocortisone. Moreover, steroids caused more episodes of superinfection, including new sepsis and septic shock [12].

The short synacthen test safely examines adrenal function and, in non-stressed subjects, adrenal dysfunction is defined as a post-short synacthen test cortisol level of less than 500 to 550 nmol/L [13]. Up to now, no guidelines have been forthcoming from the French Societies of Endocrinology and of Anesthesia and Intensive Care, and there are only a few, limited US recommendations for diagnostic criteria to define adrenal dysfunction in critical illness, including a delta cortisol (cortisol increment after a short 250 µg synacthen test) of less than 250 nmol/L and a random total cortisol of less than 276 nmol/L [14]. Moreover, a low-dose short synacthen test (1 µg) is thought to be more sensitive for diagnosing infraclinical adrenal dysfunction in non-stressed patients. However, given the limited data available for the use of a low-dose short synacthen test, there is currently no consensus as to the appropriate high-dose or low-dose short synacthen test applicable as criteria for normal adrenal function. At this time, several questions still need to be addressed.

### Is the assessment of adrenal function using serum total cortisol reliable?

More than 90% of the circulating cortisol in serum is bound to proteins (transcortin and albumin). This means that alterations in these binding proteins are likely to affect measures of serum total cortisol levels and the interpretation of the results of tests assessing adrenal function. Standard assays of serum cortisol determine total (bound plus free fractions) hormone concentrations and are probably inaccurate for assessing adrenal failure in patients with liver insufficiency, as transcortin and albumin are both synthesized in the liver. The present authors believe that the reported prevalences of adrenal dysfunction in cirrhotic patients are misleading and overestimated (Table 1), and need to be corrected by free cortisol measurement. Indeed, it was recently observed that nearly 40% of critically ill patients with hypoproteinemia had subnormal serum total cortisol values despite normal adrenal function, as determined by appropriately raised baseline and post-short synacthen test serum free cortisol levels [15]. Free cortisol is currently considered a biologically active hormone at the cellular level

**Table 1** Studies assessing adrenal dysfunction in cirrhotic patients using the standard synacthen test.

Reference	n	Cirrhosis	Criteria for adrenal dysfunction	Adrenal dysfunction (%)	Factors associated with adrenal dysfunction	Outcome
Tsai et al. [5]	101	With severe sepsis <sup>a</sup>	250 µg SST: T0 < 414 nM; delta <sup>b</sup> < 248 nM with T0 between 414 and 938 nM	51.4	MAP, serum bilirubin level, vasopressor dependency, bacteremia	Higher hospital mortality rate in adrenal dysfunction patients (80.7% vs 36.7%; <i>p</i> < 0.001)
Fernandez et al. [4]	25	With septic shock	250 µg SST: T0 < 414 nM; delta < 248 nM with T60 < 938 nM	68	More frequent in Child–Pugh C vs B (76% vs 25%; <i>p</i> = 0.08)	Faster resolution of shock; improved survival vs historical controls
Thierry et al. [6]	14	With septic shock	250 µg SST: T0 < 414 nM; delta < 248 nM	77	Negative correlation between MELD score and cortisol levels	NA
Sigalas et al. [7]	47	Stable without sepsis	1 µg and 250 µg SST: T0 < 250 nM; delta < 250 nM	36	More frequent in Child–Pugh C	NA
Jang et al. [8]	18	Stable without sepsis	250 µg SST: T0 < 414 nM; delta < 248 nM	83.3	NA	NA
Galbois et al. [9]	76	Stable without sepsis	250 µg SST: T0 < 248 nM; T60 < 497 nM or delta < 248 nM	31.5	High Child–Pugh score; low serum HDL cholesterol	NA

MAP: mean arterial pressure; SST: short synacthen test; T0: baseline cortisol level; MELD: model for end-stage liver disease; NA: not available.

All cortisol values expressed in µg/dL have been converted to nM (1 µg/dL = 27.6 nM).

<sup>a</sup> Associated with organ dysfunction, hypoperfusion abnormality or sepsis-induced hypotension.

<sup>b</sup> Difference between baseline and peak cortisol levels.

[14], and its serum measurement appears to be the most appropriate approach to avoid any drawbacks in cirrhotic patients with or without sepsis. However, as the current assays for measuring serum free cortisol levels are costly and time-consuming, they are not routinely performed. Furthermore, the results of this specialized test are usually delayed and not suitable for guiding acute clinical decisions. For this reason, attempts have been made to obtain information on free cortisol indirectly, using indices calculated from total cortisol and cortisol-binding globulin (also named transcortin), or directly, by analyzing urine or saliva.

### Is the assessment of adrenal function using salivary cortisol promising?

Determining salivary cortisol concentrations is an easier and more reliable alternative means of measuring serum free cortisol, as cortisol levels in saliva are in equilibrium and correlate well with free cortisol levels [16]. In addition, venipuncture is more stressful than taking saliva samples and so could lead to an artifactual increase in cortisol. Furthermore, salivary cortisol testing can be carried out in standard hospital laboratories, and the results are quickly available, with a turn-around time of less than 3 hours. Several commercial devices are suitable for the collection of saliva samples and subsequent cortisol analysis. Salivary cortisol concentrations are determined by direct radioimmunoassay, now often replaced by non-radioactive Elisa methods or by innovative technology such as liquid chromatography coupled with mass spectrometry [17]. Nevertheless, results need to be interpreted with caution, as wide variations in normal values are observed between laboratories using different assays or even between laboratories using the same technique [18]. To date, as there is no currently available universal assay to measure salivary cortisol, but only 'home-made' assays, it is mandatory for each laboratory to establish its own reference value. It should also be borne in mind that most commercial laboratory reference ranges are developed from healthy volunteer samples and generally do not account for age, gender or other specific medical conditions such as cirrhosis.

Despite these shortcomings, however, this easy test has already proved useful for evaluating critically ill patients with chronic renal failure, HIV infection and adrenal insufficiency [19]. Indeed, Galbois et al. [9] assessed adrenal function in 73 hemodynamically stable cirrhotic patients (74% Child–Pugh C) using salivary and serum total cortisol determinations. These two methods led to discrepant results, with adrenal dysfunction observed in 6.8% by cortisol salivary assessment compared with 31.5% using cortisol serum determinations, thereby confirming that the latter can overestimate adrenal insufficiency in cirrhotic patients. Serum total cortisol correlated with the salivary method only when the albumin level was more than 25 g/L. In this study, the cutoff level of post-synacthen salivary cortisol was 12.9 ng/mL (35.6 nmol/L), but no correlation was performed with the serum free cortisol levels.

Another recent study assessed salivary cortisol and serum free cortisol levels in 51 critically ill patients (excluding liver disease), divided into two groups based on their serum albumin levels (less or equal to 25 g/L or greater than 25 g/L).

Table 2 The Coolens formula [22].

$U^2 \times K (1 + N) + U [1 + N + K (G - T)] - T = 0$ <p>where concentrations of G and T are expressed as <math>\mu\text{M}</math>, and a value of <math>3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}</math> was used for K and a constant value of 1.74 for N</p> $U (\mu\text{M}) = [(Z^2 + 0.0122 T)]^{1/2} - Z$ <p>where <math>Z (\mu\text{M}) = 0.0167 + 0.182 (G - T)</math></p> <p>U, T and G correspond to molar concentrations of unbound cortisol, total cortisol and cortisol-binding globulin, respectively</p> <p>K: affinity of cortisol-binding globulin for cortisol at 37 °C;</p> <p>N: ratio of albumin-bound to unbound cortisol</p>
--

The authors found that the rise in salivary cortisol and serum free cortisol levels were well correlated regardless of the cortisol-bound proteins [20]. This relationship between salivary and serum free cortisol was similar within the range of high serum free cortisol levels observed during critical illness (55 to 276 nmol/L), but the data are lacking for such a correlation in the lower ranges. In contrast, serum total cortisol levels in patients with low albumin levels (less than 25 g/L) were lower than in those with similar illnesses, but with near-normal albumin levels (greater than 25 g/L), even though both groups of patients had similar elevated serum free and salivary cortisol concentrations. This study confirmed that measuring only the serum total cortisol in such hypoproteinemic patients led to overestimated diagnoses of adrenal dysfunction [20].

Two different approaches were deemed successful for measuring serum free cortisol levels and taking into account serum transcortin levels. One approach, the free cortisol index—calculated as cortisol concentration divided by transcortin level—is a promising surrogate marker [21]. However, this index needs to be further investigated in cirrhotic patients as it does not provide direct measurements of free cortisol and fails to take into account the frequently low serum albumin levels in these patients. The index is currently used more often as a correction factor to better interpret total cortisol. The other approach is the formula introduced by Coolens et al. [22], which estimates free cortisol levels from total cortisol and cortisol-binding globulin levels, thereby obviating the need for complex methods of serum free cortisol measurement such as centrifugal ultrafiltration or equilibrium dialysis. A well-designed study aimed at comparing total and free cortisol under basal and post-synacthen conditions evaluated the use of this method in patients with septic shock or sepsis and in healthy controls [23]. In this study, the Coolens calculation proved to be a reliable predictor of measured free cortisol even though some patients were hypoalbuminemic. However, additional data are needed to validate these findings in cirrhosis before suggesting the routine use of this complex formula (Table 2).

### Adrenal failure in cirrhosis: what is the evidence?

Despite the difficulties of diagnosing adrenal dysfunction in septic cirrhotic patients, prompt identification of impaired cortisol production is of major clinical importance because



of the possible key role of a blunted corticoid response in the clinical deterioration of such patients. The serum or salivary free cortisol assay is a promising test, but is not commonly used at present except in clinical research, probably because it is not readily available and the normal range is as yet undetermined. Pending further investigations of free cortisol dosages, we recommend implementing the American College of Critical Care Medicine suggestions for adrenal dysfunction diagnosis in critically ill cirrhotic patients [14]. However, the main drawback is that most critically ill patients are classified as adrenal dysfunction patients. As a result, they may be receiving unnecessary treatment with glucocorticoids and being exposed to the potential adverse effects of steroids (hyperglycemia, myopathy, neurotoxicity, fluid retention and immunosuppression).

As for serum free cortisol, two issues have yet to be clarified. The first deals with the relevant free cortisol range required to produce an effect, a point that is likely to remain unresolved for some time as it is not possible to measure tissue glucocorticoid resistance. Nevertheless, it has been said that, in sepsis, there may be a reduced affinity of cellular receptors for glucocorticoids. The second issue is the reference range of serum free cortisol that is considered the gold-standard dose in healthy and septic cirrhosis patients. During critical illnesses, adrenal dysfunction may be defined by a serum free cortisol level of less than 50 to 55 nmol/L at baseline or less than 86 nmol/L after synacthen stimulation [15,16]. The reference range for baseline serum free cortisol in healthy subjects also varies—from 8.3–25.9 nmol/L, according to Arifah [16], to 12.4–70.1 nmol/L, according to the Strasbourg laboratory [24]. In addition, growing experience with salivary cortisol testing shows that a significant percentage of cirrhotic or intubated critically ill patients have abnormal salivary flow and, as a result, produce an inadequate salivary sample. Furthermore, gingival or buccal hemorrhage (leading to serum contamination) and oral candidiasis (likely to lead to underestimation of cortisol concentration) place additional limits on salivary sampling. Prospective trials in such patients are needed to ascertain whether or not salivary cortisol is a good surrogate marker—defined as a convincing association with a definitive clinical outcome—and to determine the best cutoff point for differentiating patients with and without adrenal dysfunction.

In conclusion, in spite of the shortcomings mentioned above, cortisol salivary measurement is a promising means of diagnosing suspected adrenal dysfunction in cirrhotic patients, and is of particular value in cases of altered serum protein levels. Salivary cortisol testing has the following advantages: it is less invasive than the standard synacthen test, administered intravenously, and allows multiple samples to be collected in outpatients; it reflects the biological active steroid; and it may be better at detecting critically ill patients with true adrenal dysfunction, regardless of serum protein levels, thus avoiding prolonged and potentially harmful high-dose glucocorticoid therapy.

However, the optimal method and cutoff values for diagnosing possible adrenal dysfunction remain a matter of debate. Another concern is the reproducibility of the synacthen test in septic shock patients, as changes in cortisol production can occur within very short periods of time, which means that a single assessment by synacthen test

could fail to detect adrenal dysfunction. The time interval between a patient's admission to hospital and the synacthen test may also greatly affect observed cortisol values. In addition, a blunted response may be more indicative of adrenal exhaustion than insufficiency.

Nevertheless, the CORTICIR study is ongoing and should increase our knowledge of the relationship between free cortisol measured in saliva and serum, and serum total cortisol, in both cirrhotic patients with various degrees of liver insufficiency and septic cirrhotic patients.

## Conflict of interests

None.

## Acknowledgements

We thank Professor Jean-Louis Schlienger for his critical reading of the manuscript, and the following members of the CORTICIR study group for their contributions to the ongoing study: Jean-Paul Cervoni, Denis Cléau, Vincent Di Martino, Serge Fratte, Patrick Hillon, Stéphanie Kury, Stéphanie Lemaire, Anne Minello, Emilie Muel, Carinne Richou, Franck Schillo, Pascal Thibault, Simona Tirziu and Claire Vanlemmens.

## References

- [1] Harry R, Auzinger G, Wendon J. The clinical importance of adrenal insufficiency in acute hepatic dysfunction. *Hepatology* 2002;36:395–402.
- [2] Harry R, Auzinger G, Wendon J. The effects of supraphysiological doses of corticosteroids in hypotensive liver failure. *Liver Int* 2003;23:71–7.
- [3] Marik PE, Gayowski T, Starzl TE. The hepatoadrenal syndrome: a common yet unrecognized clinical condition. *Crit Care Med* 2005;33:1254–9.
- [4] Fernandez J, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis and septic shock: effect of treatment with hydrocortisone on survival. *Hepatology* 2006;44:1288–95.
- [5] Tsai MH, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis, severe sepsis and septic shock. *Hepatology* 2006;43:673–81.
- [6] Thierry S, Giroux Leprieur E, Lecuyer L, Brocas E, Van de Louw A. Echocardiographic features, mortality, and adrenal function in patients with cirrhosis and septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008;52:45–51.
- [7] Sigalas A, Xirouchakis E, Manousou P, Corbani A, Calvaruso V, Patch D, et al. Adrenal impairment is frequent finding in stable cirrhosis and is related to disease severity. *Hepatology* 2007;46:573A.
- [8] Jang JY, Cho WY, Jeong SW, Kim SG, Cheon YK, Kim YS, et al. Relative adrenal insufficiency in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 2008;48:1088A.
- [9] Galbois A, Massard J, Reignier S, Fulla Y, Bennani A, Bonnefont-Rousselot D, et al. Hepato-adrenal syndrome: myth or reality? Usefulness of salivary cortisol assay. *Hepatology* 2008;48:1054A.
- [10] Borkowski AJ, Levin S, Delcroix C, Mahler A, Verhas V. Blood cholesterol and hydrocortisone production in man: quantitative aspects of the utilization of circulating cholesterol by the adrenals at rest and under adrenocorticotropin stimulation. *J Clin Invest* 1967;46:797–811.

- [11] Van der Voort PH, Gerritsen RT, Bakker AJ, Boerma EC, Kuiper MA, de Heide L. HDL-cholesterol level and cortisol response to synacthen in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2003;29:2199–203.
- [12] Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* 2008;358:111–24.
- [13] Annane D, Maxime V, Ibrahim F, Alvarez JC, Abe E, Boudou P. Diagnosis of adrenal insufficiency in severe sepsis and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1319–26.
- [14] Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Artl W, et al. Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med* 2008;36:1937–49.
- [15] Hamrahian AH, Oseni TS, Arafah BM. Measurements of serum free cortisol in critically ill patients. *N Engl J Med* 2004;350:1629–38.
- [16] Arafah BM. Hypothalamic pituitary adrenal function during critical illness: limitations of current assessment methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3725–45.
- [17] Gröschl M. Current status of salivary hormone analysis. *Clin Chem* 2008;54:1759–69.
- [18] Nunes ML, Vattaut S, Corcuff JB, Rault A, Loiseau H, Gatta B, et al. Late-night salivary cortisol for diagnosis of overt and subclinical Cushing's syndrome in hospitalized and ambulatory patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:456–62.
- [19] Raff H, Brock S, Findling JW. Cosyntropin-stimulated salivary cortisol in hospitalized patients with hypoproteinemia. *Endocrine* 2008;34:68–74.
- [20] Arafah BM, Nishiyama FJ, Tlaygeh H, Hejal R. Measurement of salivary cortisol concentration in the assessment of adrenal function in critically ill subjects: a surrogate marker of the circulating free cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2965–71.
- [21] Le Roux CW, Chapman GA, Kong WM, Dhillon WS, Jones J, Alaghband-Zadeh J. Free cortisol index is better than serum total cortisol in determining hypothalamic-pituitary-adrenal status in patients undergoing surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2045–8.
- [22] Coolens J, Baelen HV, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem* 1987;26:197–202.
- [23] Ho JT, Al-Musalhi H, Chapman MJ, Quach T, Thomas PD, Bagley CJ, et al. Septic shock and sepsis: a comparison of total and free plasma cortisol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:105–14.
- [24] Schlienger JL, Sapin R, Gasser F, Briche-Prouveur S, Dreyfuss M. Intérêt du cortisol libre plasmatique en pratique clinique. *Sem Hop Paris* 1989;65:2067–70.

Ce point vue, publié dans la revue française *Gastroenterologie Clinique et Biologique* commentait avec un œil critique les travaux faisant suspecter une forte prévalence d'insuffisance surrénale au cours de la cirrhose. Les commentaires ont déjà été développés dans la première partie de la présente thèse. Nos conclusions étaient qu'il fallait promouvoir la recherche utilisant le cortisol libre sérique ou salivaire pour tenter de standardiser ces mesures. L'intérêt principal du dosage du cortisol libre sérique est qu'il représente l'hormone biologiquement active. Le dosage du cortisol salivaire est une technique déjà utilisée en endocrinologie et pourrait être davantage utilisé en cas de maladie du foie car elle présente plusieurs avantages par rapport au dosage du cortisol libre sérique : son moindre coût, son caractère non invasif et son utilisation aisée avec un résultat pouvant s'obtenir assez rapidement. Cet éditorial réalisé avec la complicité de l'équipe d'Endocrinologie de Besançon et du Pr Schlienger (CHU Hautepierre-Strasbourg, service de médecine interne, endocrinologie et nutrition) m'a permis de développer une recherche clinique dans ce domaine.

### **3.6) Article 6**

**Thevenot T**, Borot S, Remy-Martin A, Sapin R, Cervoni JP, Richou C, Vanlemmens C, Cleau D, Muel E, Minello A, Tirziu S, Penfornis A, Di Martino V, Monnet E.

Assessment of adrenal function in cirrhotic patients  
using concentration of serum free and salivary  
cortisol

*Liver International* 2011;31:425-33.



CLINICAL STUDIES

## Assessment of adrenal function in cirrhotic patients using concentration of serum-free and salivary cortisol

Thierry Thevenot<sup>1,2</sup>, Sophie Borot<sup>3</sup>, Agnès Remy-Martin<sup>4</sup>, Remy Sapin<sup>5</sup>, Jean-Paul Cervoni<sup>1</sup>, Carine Richou<sup>1</sup>, Claire Vanlemmens<sup>1</sup>, Denis Cleau<sup>6</sup>, Emilie Muel<sup>1,7</sup>, Anne Minello<sup>8</sup>, Simona Tirziu<sup>6</sup>, Alfred Penforis<sup>3</sup>, Vincent Di Martino<sup>1,2</sup> and Elisabeth Monnet<sup>1,2</sup>

1 Service d'Hépatologie et de Soins Intensifs Digestifs, Hôpital Jean Minjoz, Besançon cedex, France

2 EA UPRES 3186, 'Agents Pathogènes et Inflammation', de l'Université de Franche-Comté, Besançon cedex, France

3 Service d'Endocrinologie-Métabolisme et Diabétologie-Nutrition, Hôpital Jean Minjoz, Besançon cedex, France

4 Service de Biochimie Hormonale, Hôpital Jean Minjoz, Besançon cedex, France

5 Service d'Exploration Fonctionnelle par les Isotopes, 1 place de l'Hôpital, Hôpital civil de Strasbourg, Strasbourg Cedex, France

6 Service d'Hépatogastroentérologie, Hôpital de Vesoul, Vesoul Cedex, France

7 Centre d'Investigation Clinique, Hôpital Saint Jacques, Besançon cedex, France

8 Service d'Hépatogastroentérologie, Hôpital du Bocage, Dijon Cedex, France

### Keywords

adrenal insufficiency – cirrhosis – cortisol – sepsis

### Abbreviations

CBG, corticosteroid-binding globulin;  
CV, coefficient of variation; SST, short  
synacthen test

### Correspondence

Dr Thevenot Thierry, Service d'Hépatologie et  
de Soins Intensifs Digestifs, Hôpital Jean Minjoz,  
25000 Besançon cedex, France  
Tel: +33 3 81 66 85 94  
Fax: +33 3 81 66 84 18  
e-mail: tthevenot@chu-besancon.fr

Received 30 August 2010

Accepted 16 November 2010

DOI: 10.1111/j.1478-3223.2010.02431.x

### Abstract

**Objective:** Because over 90% of serum cortisol is bound to albumin and corticosteroid-binding globulin (CBG), changes in these proteins can affect measures of serum total cortisol levels in cirrhotics without altering serum-free and salivary cortisol concentrations. **Methods:** We assessed basal ( $T_0$ ) and post-synacthen ( $T_{60}$ ) serum total cortisol, serum-free and salivary cortisol in 125 consecutive cirrhotics (95 non-septic and 30 septic patients with a Child > 8). **Results:** Serum total cortisol levels significantly decreased from the Child A–C non-septic group, as did albumin and CBG levels, with a non-significant rise in serum-free cortisol concentrations. Non-septic patients with low albumin ( $\leq 25$  g/L) or CBG levels ( $\leq 35$  mg/L) had lower  $T_0$  serum total cortisol levels than patients with near-normal albumin (303.4 vs. 382.6 nmol/L;  $P = 0.0035$ ) or with normal CBG levels (289.9 vs. 441.4 nmol/L;  $P < 0.0001$ ), respectively, despite similar serum-free cortisol or salivary cortisol concentrations. Subnormal  $T_{60}$  serum total cortisol concentrations ( $< 510.4$  nmol/L) were measured in 7.2% of all patients (Child C: 14.5% vs. Child A and B: 0%;  $P = 0.0013$ ) but no patients exhibited symptoms suggesting adrenal insufficiency. Patients with or without subnormal  $T_{60}$  total cortisol had similar  $T_0$  salivary cortisol and serum-free cortisol concentrations. A trend was observed towards high serum-free cortisol concentrations and mortality in multivariate analysis. **Conclusions:** Serum total cortisol levels overestimated the prevalence of adrenal dysfunction in cirrhotics with end-stage liver disease. Since serum-free cortisol cannot be measured routinely, salivary cortisol testing could represent a useful approach but needs to be standardized.

Few studies have assessed adrenal function in the context of liver disease (1–6), but adrenal dysfunction has been reported with a high frequency of 77% in cirrhotic patients with septic shock (5). However, all studies evaluating adrenal function in critically ill cirrhotic patients are based on serum total cortisol concentration including the serum-free cortisol fraction, which is responsible for physiologic function (7), and the protein-bound cortisol fraction. Because over 90% of circulating cortisol in serum is bound to proteins, namely corticosteroid-binding globulin (CBG) and albumin, reduced serum concentrations of these two proteins may be associated with a reduction in the bound-cortisol fraction. Therefore, serum total cortisol concentrations

may be lower without altering the free biologically active hormone. We hypothesize that standard assays for serum total cortisol measurements misleadingly overestimate adrenal dysfunction in patients with liver insufficiency, as CBG and albumin are both synthesized in the liver. Indeed, it was recently reported that nearly 40% of critically ill patients with hypoalbuminaemia had lower serum total cortisol values than patients with near-normal albumin concentrations but similar appropriately elevated free cortisol concentrations before and after the short synacthen test (SST) (8). Serum-free cortisol concentrations cannot currently be obtained routinely. Nevertheless, salivary cortisol concentrations are more convenient to measure and are recognized as a

good surrogate marker for the serum-free cortisol concentration (9). It was recently demonstrated in critically ill patients that rises in salivary cortisol and serum-free cortisol concentrations are well-correlated within the range of high serum-free cortisol concentrations observed during critical illness (55–276 nmol/L), regardless of cortisol bound-proteins (9).

Therefore, this CORTICIR study was designed: (i) to investigate the effect of the decrease in albumin and CBG concentrations on serum total cortisol, serum-free cortisol and salivary cortisol, in cirrhotic patients with varying degrees of liver insufficiency and in the context of sepsis, (ii) to compare serum-free cortisol and salivary cortisol according to the post-SST serum total cortisol concentration.

## Methods

### Study design and patient characteristics

This study was conducted in the Hepatology Unit at Besançon University Hospital between June 2008 and June 2009 with the approval of the local ethics committee. Each patient provided informed written consent conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. We prospectively enrolled 125 cirrhotic patients as follows: 95 non-septic (34 Child–Pugh A, 29 B and 32 C) and 30 septic patients (10 spontaneous bacterial peritonitis, five pneumonia, two urinary tract infections, two skin infections and 11 undetermined infections) with a Child–Pugh score  $> 8$ , recently called 'advanced cirrhotic patients' (10). The 95 non-septic patients were included during their hospitalization for a routine check-up of cirrhosis and the SST was performed after an overnight bed rest in our Unit. Inclusion criteria were patients aged between 18 and 80 and presence of cirrhosis. Diagnosis of cirrhosis was made histologically in 31 patients and was based on clinical, laboratory and ultrasonographic findings in the other patients. Exclusion criteria included treatment with corticosteroids within the past 6 months, oestrogen or ketoconazole intake, oral candida infections, gastrointestinal bleeding and septic shock. Liver failure severity was established at admission by the Child–Pugh and the model for end-stage liver disease (MELD) scores. Patients with infections were considered to have sepsis if they had a systemic inflammatory response syndrome (11). The clinical work-up of sepsis was appropriately investigated with examinations such as paracentesis for patients with ascites, blood and urine cultures, chest X-ray, ultrasonography and/or a computed tomography abdominal scan if necessary.

### Laboratory measurements

Serum total cortisol, serum-free cortisol and salivary cortisol concentrations were measured blindly before ( $T_0$ : between 8:00 and 9:00 hours) and 60 min ( $T_{60}$ ) after an intravenous injection of 250 µg tetracosactrin (Synacthen<sup>®</sup>, Novartis Pharma SAS, Rueil Malmaison,

France). Patients were not allowed to smoke, drink liquids or brush their teeth 60 min before SST and they remained recumbent throughout the test. Blood was centrifuged at 2100 g for 15 min and both serum and saliva samples were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. Laboratory assays were measured by the endocrine biochemistry laboratory of Besançon hospital, except for CBG (Biomnis Laboratory, Lyon, France) and the serum-free cortisol dosage (Laboratoire d'explorations fonctionnelles par les isotopes, hôpitaux universitaires de Strasbourg, France).

Serum total cortisol was measured using electrochemoluminescence-based methods on the Elecsys 2010 immunoassay analyzer (Roche Diagnostics, Meylan, France) with intra-assay coefficient of variation (CV) of 1.6% in the cortisol range of 200–1300 nmol/L. Serum-free cortisol likely constitutes a 'gold standard' and serum-free cortisol concentrations were measured by centrifugal ultrafiltration. Serum was filtered by centrifugation at  $37^{\circ}\text{C}$  through a Centrifree YM-30 (Millipore, Molsheim, France) ultrafiltration device. Free cortisol was then measured by radioimmunoassay (RIA) in the ultrafiltrable fraction of serum (DiaSorin, Antony, France). Intra-assay CV was 5.5% for a concentration of 383.6 nmol/L, and inter-assay CV was 9.1% for a concentration of 309.1 nmol/L and 6.5% for a concentration of 1404.8 nmol/L.

Saliva samples were collected with cotton tubes (Salivette Sarstedt, Rommelsdorf, Germany) placed in the mouth for at least 3 min and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for later analysis. Salivary cortisol concentrations were determined using a RIA (CORT-CT2 kit, CIS Bio International, Bagnols/cèze, France). Serum CBG assays were performed with the CBG-RIA-100 (normal range: 35–50 mg/L; Biosource radioimmunoassay, Nivelles, Belgique) and serum albumin was measured using a nephelometric method.

### Adrenal function assessment

We defined normal concentrations of post-SST serum total cortisol concentration as 510.4 nmol/L or greater and patients with concentrations of  $< 510.4$  nmol/L were considered to have subnormal response as recently reported (8). CBG, albumin, serum-free cortisol and salivary cortisol concentrations were compared according to the post-SST serum total cortisol concentration. Patients with a  $T_{60}$  subnormal response were referred to the Endocrinology Unit for further investigations.

### Statistical analysis

Because no data on serum-free cortisol levels in cirrhotics were available, the sample size was calculated using mean and common standard deviation (SD) values of serum total cortisol estimated in published series of cirrhotic patients (4, 12, 13). Numerical variables were presented as means  $\pm$  SD and categorical variables as percentages. Firstly, the analysis was restricted to non-septic patients



in order to investigate the effect of the severity of liver insufficiency on adrenal function parameters (serum-free cortisol, serum total cortisol and salivary cortisol), as well as the influence of serum albumin and CBG concentrations on total and free cortisol values. Secondly, we investigated the sepsis effect by comparing septic and non-septic patients for these parameters. The Kruskal–Wallis test with Bonferroni's correction for multiple comparisons was used for these analyses. Linear and quadratic regression models were fitted in order to study the relationship between serum total cortisol and serum-free cortisol within the four patient groups. Regression lines were compared between groups using analysis of covariance, as the assumption of homogeneity of variance between groups was not rejected. Univariate logistic regression was used to determine potential independent predictors of death without liver transplantation. Variables with a *P* value of  $< 0.2$  were dichotomized for best discrimination between survivors and non-survivors by the construction of receiver operating characteristic curves. Predictors were then entered into a stepwise variable selection procedure by multivariate logistic regression with a backward approach (a significance level of 0.2 to retain variables in the model was used). The predictors with a *P* value of  $< 0.05$  were retained. All analyses were performed using the SAS version 9.1 for Windows (Institute Inc., Cary, NC, USA).

## Results

### Clinical characteristics of the patients

Our four groups were well-balanced at baseline concerning age, sex distribution and aetiology of cirrhosis (Table 1). The mean patient age was  $58 \pm 10$  years (range, 32–80) and there were 86 men (68.8%). The main cause of liver cirrhosis was alcohol ( $n = 105$ , 84%) and 52 patients remained active drinkers. The frequency of active drinkers was not significantly different in the four groups ( $P = 0.09$ ). The time elapsed (mean  $\pm$  SD) between the sepsis and the SST was  $1.8 \pm 1.5$  days.

### Effect of the severity of liver insufficiency on adrenal function in non-septic patients (Table 2 and Fig. 1)

The mean values of  $T_0$  and  $T_{60}$  serum total cortisol concentrations were significantly lower in Child–Pugh C compared with Child–Pugh A patients, with a 24 and 26% decrease respectively. Conversely,  $T_0$  and  $T_{60}$  serum-free cortisol and salivary cortisol concentrations showed a growing non-significant trend from Child–Pugh A to Child–Pugh C stages.  $T_0$  (Child A:  $9.3 \pm 3.3\%$  vs. Child C:  $22 \pm 16.9\%$ ;  $P < 0.0001$ ) and  $T_{60}$  (Child A:  $14.9 \pm 3.0\%$  vs. Child C:  $24.4 \pm 8.0\%$ ;  $P < 0.0001$ ) per cent-free cortisol varied significantly between Child–Pugh groups with a higher percentage in Child–Pugh C.

**Table 1.** Baseline characteristics of the 125 cirrhotic patients according to Child–Pugh grade and septic status

Characteristic	Non-septic patients			All patients	
	Child–Pugh A ( <i>n</i> = 34)	Child–Pugh B ( <i>n</i> = 29)	Child–Pugh C ( <i>n</i> = 32)	Non-septic patients ( <i>n</i> = 95)	Septic patients ( <i>n</i> = 30)
Age (year)	$58.6 \pm 8.1$	$61.3 \pm 11.3$	$54.9 \pm 9.2$	$58.2 \pm 9.7$	$57.2 \pm 10.4$
Male gender (%)	73.5	69.0	62.5	68.4	70
Body mass index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$26.9 \pm 4.8$	$26.7 \pm 5.4$	$25.0 \pm 5.1$	$26.2 \pm 5.1$	$25.6 \pm 4.8$
Alcoholic cirrhosis (%) / active drinker among alcoholic patients (%)	88.2/30	75.9/54.5	84.4/59.3	84.2/46.8	86.7/57.7
Chronic hepatitis C (%)	8.8	13.8	3.1	8.4	6.7
Mean arterial pressure (mmHg)	$93.3 \pm 12.6$	$81.4 \pm 11.4$	$76.7 \pm 12.1$	$83.0 \pm 15.4$	$78.4 \pm 13.9$
Heart rate (beats/min)	$69.8 \pm 12.0$	$67.5 \pm 13.5$	$78.6 \pm 14.9$	$71.5 \pm 14.7$	$81.7 \pm 17.3$
Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	$36.7 \pm 0.4$	$36.9 \pm 0.4$	$36.8 \pm 0.3$	$36.8 \pm 0.4$	$37.2 \pm 0.5$
MELD (score)	$10.0 \pm 3.3$	$14.9 \pm 4.1$	$23.6 \pm 6.3$	$16.1 \pm 7.4$	$23.8 \pm 8.0$
Total bilirubin ( $\mu\text{mol/L}$ )	$18.5 \pm 9.0$	$56.6 \pm 80.9$	$157.6 \pm 154.4$	$77.0 \pm 115.8$	$143.4 \pm 130.8$
Prothrombin index (%)	$77.6 \pm 14.6$	$59.1 \pm 12.1$	$40.7 \pm 14.2$	$59.5 \pm 20.6$	$43 \pm 17.1$
INR	$1.23 \pm 0.19$	$1.57 \pm 0.30$	$2.48 \pm 1.03$	$1.75 \pm 0.82$	$2.39 \pm 0.96$
Serum albumin (g/L)	$37.3 \pm 4.8$	$26.9 \pm 5.3$	$24.3 \pm 5.5$	$29.7 \pm 7.7$	$26.4 \pm 7.4$
Serum CBG (mg/L)	$44.6 \pm 12.4$	$37.0 \pm 10.2$	$27.1 \pm 10.2$	$36.4 \pm 13.2$	$32.2 \pm 15.8$
Serum creatinine ( $\mu\text{mol/L}$ )	$78.6 \pm 18.9$	$81.4 \pm 32.7$	$80.5 \pm 33.2$	$80.1 \pm 28.5$	$103.3 \pm 63$
Serum sodium (mmol/L)	$139.6 \pm 2.9$	$137.3 \pm 5.0$	$136.6 \pm 4.1$	$137.9 \pm 4.2$	$132.6 \pm 5.2$
Leucocyte count ( $\text{mm}^{-3}$ )	$6041 \pm 2026$	$6027 \pm 4025$	$6656 \pm 2903$	$6244 \pm 3022$	$10135 \pm 5989$

Non-septic patients were classified according to the Child–Pugh score, which evaluates the severity of liver disease (range, 5–15, where 5 indicates good liver function and 15 indicates poor liver function). The score was calculated on the basis of the serum bilirubin and albumin levels, the prothrombin time and the presence and degree of ascites or encephalopathy. The sum of the scores provides the Child–Pugh score, which corresponds to a Child–Pugh grade of A (range, 5–6), B (range, 7–9) or C (range, 10–15). Septic patients had a Child–Pugh score greater than 8. Quantitative values are means  $\pm$  standard deviation.

CBG, corticosteroid-binding globulin; MELD, model for end-stage liver disease; INR, international normalized ratio.

Table 2. Adrenal function assessment in 95 non-septic cirrhotic patients

Variable	Child-Pugh A (n = 34)	Child-Pugh B (n = 29)	Child-Pugh C (n = 32)	P value <sup>†</sup>
Serum total cortisol				
Basal values (nmol/L)	409.2 ± 155.3	356.3 ± 120.0	311.5 ± 196.9 <sup>EE</sup>	0.0035
Range	16–694	123–605	19–968	
Median	420	367	263	
Post-synacthen values (nmol/L)	918.9 ± 208.8	777.9 ± 130.1	680.2 ± 263.5 <sup>E</sup>	< 0.0001
Range	527–1398	546–978	114–1523	
Median	899	775	621	
Salivary cortisol				
Basal values (nmol/L)	15.2 ± 9.7	17.7 ± 10.7	20.6 ± 12.5	NS
Range	0.6–47	4–47	6–47	
Median	12	13	16	
Post-synacthen values (nmol/L)	71.3 ± 31.6	80.0 ± 28.7	83.9 ± 44.3	NS
Range	29–150	24–143	12–200	
Median	69.5	81.0	74.0	
Serum-free cortisol				
Basal values (nmol/L)	36.4 ± 17.8	51.0 ± 37.8	59.9 ± 44.7	NS
Range	2.8–84.7	16.8–188.0	14.9–228.0	
Median	33.7	37.8	45.6	
As a percentage of total cortisol	9.3 ± 3.3 <sup>†</sup>	13.9 ± 7.7 <sup>‡</sup>	22 ± 16.9 <sup>‡</sup>	< 0.0001
Post-synacthen values (nmol/L)	139.8 ± 51.8	132.5 ± 46.0	161.0 ± 73.3	NS
Range	36.1–285.0	31.7–305.0	26.8–364.0	
Median	130.9	131.0	145.3	
As a percentage of total cortisol	14.9 ± 3.0	17.1 ± 5.1 <sup>‡‡</sup>	24.4 ± 8.0 <sup>‡</sup>	< 0.0001

Quantitative values are means ± standard deviation.

Within-group comparison was performed after Bonferroni correction,  $P < 0.006$ .

<sup>†</sup> $P = 0.0014$  for the comparison between A and B respectively.

<sup>E</sup> $P < 0.0001$  and

<sup>EE</sup> $P = 0.0032$  for the comparison between A and C respectively.

<sup>‡</sup> $P = 0.001$  and

<sup>‡‡</sup> $P < 0.0001$  for the comparison between B and C respectively. All cortisol values are expressed in nmol/L (1 µg/dL = 27.6 nmol/L).

<sup>††</sup>P value for comparison within the four groups using the Kruskal–Wallis test.

NS, non-significant.

Changes of serum total cortisol concentrations were associated with a decrease in albumin and CBG concentrations, which was particularly marked in the Child–Pugh C group. Patients with low serum albumin ( $\leq 25$  g/L) had lower  $T_0$  serum total cortisol concentrations than others ( $303.4 \pm 179.2$  vs.  $382.6 \pm 154.6$  nmol/L;  $P = 0.0035$ ). Similarly, patients with low serum CBG ( $\leq 35$  mg/L) had lower  $T_0$  serum total cortisol concentrations as compared with patients with normal CBG ( $289.9 \pm 138.7$  vs.  $441.4 \pm 156.7$  nmol/L;  $P < 0.0001$ ). Patients with normal concentrations of both albumin and CBG had higher serum total cortisol concentrations as compared with others ( $432.1 \pm 131.0$  vs.  $310.0 \pm 168.6$  nmol/L;  $P < 0.0001$ ). Interestingly, there were no significant changes in serum-free cortisol concentrations or in salivary cortisol concentrations, regardless of serum albumin or CBG concentrations, through the Child–Pugh A to C group.

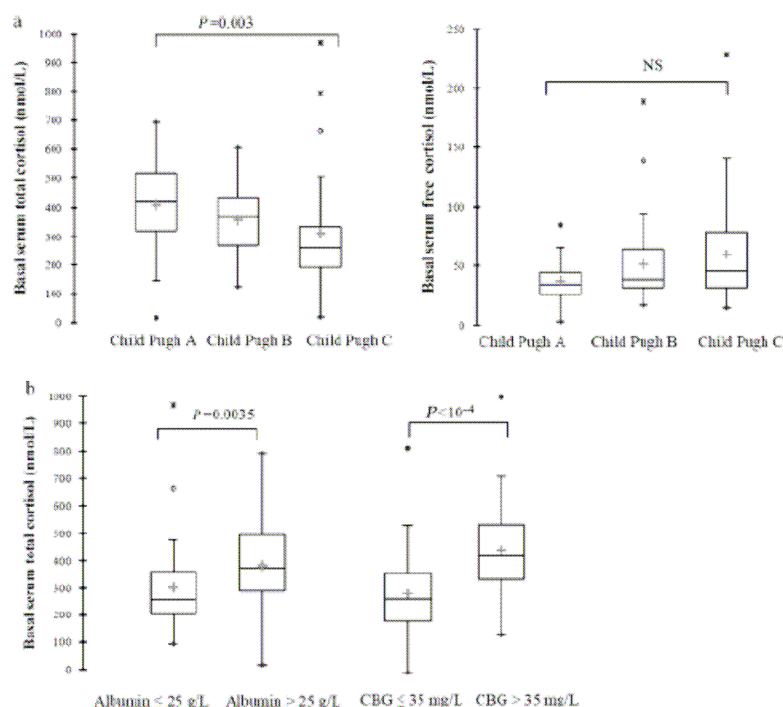
#### Effect of sepsis on adrenal function

On comparing the subgroup of 42 non-septic patients having a Child–Pugh score  $> 8$  to the 30 septic patients

(Table 3),  $T_0$  serum total cortisol concentrations were significantly lower in the non-septic patients group ( $311.9 \pm 184.0$  vs.  $443.1 \pm 181.4$  nmol/L;  $P = 0.0013$ ), despite similar serum albumin or CBG concentrations. Serum-free cortisol or salivary cortisol concentrations were higher in septic patients but the difference did not reach statistical significance.

#### Relationship between serum total cortisol and serum-free cortisol

In all four patient groups, there was a highly significant linear correlation between serum total cortisol and serum-free cortisol levels ( $R^2 = 0.37$ ,  $P < 0.0001$ ). The quadratic model did not fit the data significantly better than the linear one. Analysis of covariance showed that regression lines significantly differed between the four patient groups ( $P < 0.0001$ ), the slope of the line in Child–Pugh A patients tending to be different from those in the other groups (Fig. 2). At equal levels of serum total cortisol, the serum-free cortisol level was significantly higher in Child–Pugh C than B ( $P = 0.025$ ) or A ( $P < 0.0001$ ).



**Fig. 1.** Box plots showing  $T_0$  total and free serum cortisol levels in the three cirrhotic non-septic groups (a) and variation of basal serum total cortisol levels according to the cortisol-binding proteins (b). (a) Basal serum total and free cortisol levels in the three cirrhotic non-septic groups ( $n=95$ ). Plots show that  $T_0$  serum total cortisol levels decreased significantly through Child–Pugh A to C grade; conversely, we observe a non-significant rise of serum-free cortisol levels. (b) The comparison of  $T_0$  serum total cortisol levels in non-septic patients according to their serum albumin levels ( $\leq 25$  g/L in 27 patients vs.  $> 25$  g/L in 68 patients) and to their serum corticosteroid-binding globulin levels ( $\leq 35$  mg/L in 51 patients vs.  $> 35$  mg/L in 44 patients). Boxes show interquartile ranges, and error bars represent the lowest and highest observed values within 1.5 times the length of the box. Data points outside this range are shown individually. Plus signs denote mean values, and horizontal lines median values. Box plots demonstrate significant lower serum total cortisol levels in patients with low cortisol-binding proteins.

#### Assessment of adrenal function according to post-short synacthen test serum total cortisol concentrations

In the whole population, 'subnormal' ( $< 510.4$  nmol/L or  $18.5$   $\mu$ g/dl) and 'normal'  $T_{60}$  serum total cortisol concentrations ( $\geq 510.4$  nmol/L) were found in nine Child–Pugh C patients (six non-septic and three septic; Child C: 14.5% vs. Child A and B: 0%;  $P=0.0013$ ) and 116 patients respectively. Patients with a 'subnormal'  $T_{60}$  response to the SST had lower  $T_0$  serum total cortisol concentrations than those with a 'normal' response despite similar  $T_0$  salivary cortisol and serum-free cortisol concentrations (Table 4). Patients with a 'subnormal' response to the SST had more severe liver disease than their counterparts, as reflected by a higher MELD score ( $25.3 \pm 7.5$  vs.  $17.4 \pm 8.0$ ;  $P=0.0078$ ) and lower albumin ( $22.7 \pm 4.9$  vs.  $29.4 \pm 7.7$  g/L;  $P=0.009$ ) and CBG ( $25.7 \pm 8.8$  vs.  $36.1 \pm 13.9$  mg/L;  $P=0.020$ ) concentrations. The number of septic patients and the mortality rate were quite similar in these two groups.

As previously reported (14), we observed that our 10 patients with chronic active hepatitis (chronic hepatitis C herein) had high CBG concentrations compared with

those of other aetiologies ( $43.8 \pm 14.1$  vs.  $34.6 \pm 13.7$  mg/L;  $P=0.038$ ) despite similar MELD scores and a similar percentage of septic patients.

#### Outcome

The mean follow-up duration of our patients was  $10.0 \pm 5.8$  months, and 29 patients (23.2%) died within a mean follow-up of  $3.0 \pm 3.2$  months. Causes of death without liver transplantation were sepsis-related in 13 patients, end-stage liver failure in eight patients, bleeding-related in two patients, oesophagus cancer in one, and unknown in four other patients. Eight patients received a liver transplant and one of these patients died just after the procedure. Apart the eight transplant patients, baseline characteristics of non-survivors ( $n=28$ ) displayed significant differences as compared with survivors ( $n=89$ ) regarding Child–Pugh score ( $10.5 \pm 1.6$  vs.  $8.0 \pm 2.5$ ;  $P<0.0001$ ), MELD score ( $23.3 \pm 7.9$  vs.  $15.5 \pm 7.1$ ;  $P<0.0001$ ) and  $T_0$  serum-free cortisol concentrations ( $65.6 \pm 47.7$  vs.  $47.3 \pm 30.3$  nmol/L;  $P<0.04$ ) while age, sepsis,  $T_0$  salivary cortisol and



**Table 3.** Adrenal function assessment in septic and in non-septic cirrhotic patients with a Child–Pugh score  $\geq 8$ 

Hormonal characteristics	Non-septic patients ( <i>n</i> = 42)	Septic patients ( <i>n</i> = 30)	<i>P</i> value
Serum total cortisol			
Basal values (nmol/L)	311.9 $\pm$ 184.0	443.1 $\pm$ 181.4	0.0013
Range	16–968	185–828	
Median	270.5	390.0	
Post-synacthen values (nmol/L)	699.0 $\pm$ 242.1	807.4 $\pm$ 213.7	NS
Range	114–972	242–1235	
Median	666.0	792.5	
Salivary cortisol			
Basal values (nmol/L)	19.7 $\pm$ 12.1	30.2 $\pm$ 31.8	NS
Range	6–46	9–171	
Median	16.0	19.0	
Post-synacthen values (nmol/L)	86.8 $\pm$ 40.6	74.7 $\pm$ 32.8	NS
Range	12–185	19–138	
Median	86.0	71.5	
Serum-free cortisol			
Basal values (nmol/L)	55.4 $\pm$ 41.6	75.3 $\pm$ 43.4	NS
Range	14.9–140.0	22.1–173.0	
Median	37.9	59.0	
Post-synacthen values (nmol/L)	158.2 $\pm$ 70.1	183.7 $\pm$ 87.5	NS
Range	26.8–265.0	58.6–413.1	
Median	134.6	161.7	
Serum albumin (g/L)	24.9 $\pm$ 5.6	26.4 $\pm$ 7.4	NS
Serum CBG (mg/L)	28.7 $\pm$ 10.2	32.2 $\pm$ 15.8	NS

Quantitative values are means  $\pm$  standard deviation.

Within-group comparison was performed after Bonferroni correction,  $P < 0.006$ .

All cortisol values are expressed in nmol/L (1  $\mu$ g/dl = 27.6 nmol/L).

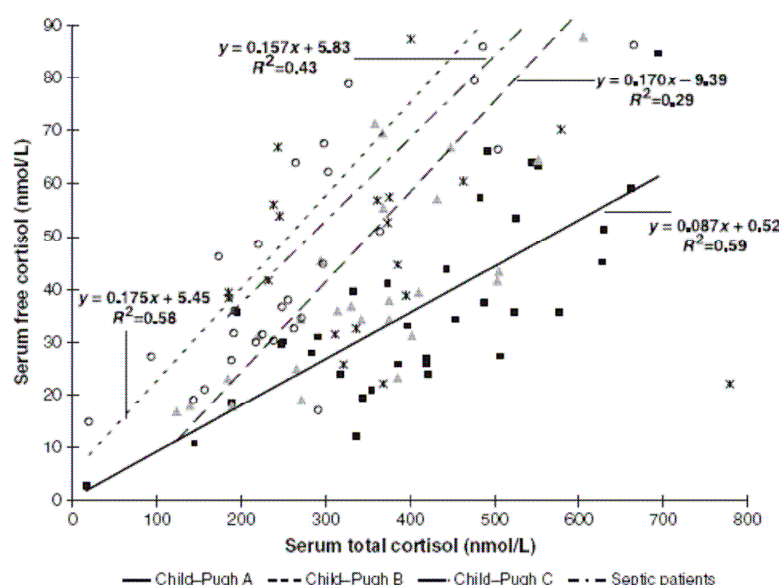
CBG, corticosteroid-binding globulin; NS, non-significant.

serum total cortisol concentrations, and CBG concentrations were not significantly different. Receiver operating characteristic curves determined the best cut-off point discriminating survivors from non-survivors regarding age ( $\geq 64$  years), Child–Pugh score (score  $\geq 9$ ), MELD score ( $\geq 24$ ) and serum-free cortisol concentrations ( $\geq 64.5$  nmol/L). Because the Child–Pugh score and the MELD score are collinear, they are used separately in two multivariate logistic regression analyses for predicting mortality without liver transplantation (Table 5). In these two models, predictors of mortality were a high MELD score or a high Child–Pugh score and older age. In both models, a trend was only observed towards high baseline serum-free cortisol concentrations and mortality.

## Discussion

Our main results were firstly that serum total cortisol concentrations decreased gradually in non-septic patients as liver function deteriorated and cortisol-binding

protein concentrations decreased, and secondly that prevalence of adrenal dysfunction according to  $T_{60}$  serum total cortisol was low (nine patients, 7.2%) and restricted to patients with end-stage liver disease (Child C: 14.5% vs. Child A and B: 0%;  $P = 0.0013$ ) despite similar  $T_0$  serum-free cortisol and salivary cortisol in patients with or without a subnormal response to the SST. Moreover, no patient with a subnormal response to the SST exhibited symptoms suggesting adrenal insufficiency. For all these reasons, we think that assessment of adrenal function in cirrhotic patients with measurements of serum total cortisol misleadingly overestimates adrenal dysfunction prevalence. Moreover, attempting to define adrenal dysfunction with an arbitrary threshold value of serum cortisol concentration leads to a further increase in false-positive tests (15, 16); using such cut-off points as previously recommended, 28.1% of Child–Pugh C non-septic patients and 26.7% of septic patients would be classified as having adrenal dysfunction. In agreement with our findings, Galbois *et al.* (6) observed subnormal  $T_{60}$  serum total cortisol concentrations (i.e.  $< 496.7$  nmol/L) in 11.4% of their cirrhotic patients (10 out of 88) and in 33.0% when they combined basal,  $T_{60}$  and delta cortisol, confirming that serum cortisol concentrations were not representative of adrenal function in cirrhotic patients. Adrenal function assessment should be evaluated by the serum-free cortisol or salivary cortisol measurements since their concentrations did not vary significantly regarding serum albumin or CBG concentrations. In our study, the serum-free cortisol and the salivary cortisol concentrations tend to be higher in Child–Pugh C patients compared with Child–Pugh A, probably reflecting an adrenal response to a more severe illness. Difficulties arise when we attempt to explore adrenal function with the serum-free cortisol concentration because no study has yet explored the best threshold for identifying patients with or without adrenal dysfunction. Comparing the cut-off values previously recommended for serum-free cortisol is also problematic since different assay methodologies and patient populations are used (8, 13). In 2002, Annane *et al.* (17) reported lower mortality among patients with septic shock who were randomized to a 1-week course of low-dose steroids. However, the CORTICUS study, which intended to validate the findings of Annane and colleagues, failed to demonstrate any improvement in mortality for patients with sepsis or septic shock, but merely a quicker reversal of shock in patients receiving hydrocortisone (18). Obviously we need to resolve the knotty question of what is the 'low' serum-free cortisol concentration needed to impose glucocorticoid administration supposed to affect the clinical outcome. In our study, all but one non-survivor had 'high' serum-free cortisol concentrations, suggesting that a poor clinical outcome is not the consequence of 'low' serum-free cortisol. Marik *et al.* (16) established a new terminology in 2008: critical illness-related corticosteroid insufficiency identifying a condition of inadequate steroid activity at cellular level



**Fig. 2.** Scatter plots and regression lines of basal total cortisol and free cortisol concentrations in 125 cirrhotic patients: 34 non-septic Child-Pugh A (solid square), 29 non-septic Child-Pugh B (solid triangle), 32 non-septic Child-Pugh C (circle) and 30 septic patients (star). The 125 points plotted on the xy-plane were deleted to better visualize the regression lines. In the analysis of covariance, the regression lines of the four groups differed significantly ( $P < 0.0001$ ). Moreover, the slope of the regression line estimated for Child-Pugh A patients differed significantly from the one estimated for Child-Pugh C patients ( $P = 0.02$ ), the difference with slopes estimated for Child-Pugh B and septic patients being non-significant ( $P = 0.10$ ).

**Table 4.** Characteristics of the 125 cirrhotic patients according to post-short synacthen test serum total cortisol concentrations

Characteristics	Post-SST serum total cortisol concentrations		P value
	$\geq 510.4$ nmol/L ( $N = 116$ )	$< 510.4$ nmol/L ( $N = 9$ )	
Serum total cortisol			
Basal values (nmol/L)	$395.1 \pm 168.2$	$186.2 \pm 79.1$	0.0001
Median	373.0	185.0	
Post-synacthen values (nmol/L)	$829.5 \pm 200.8$	$395.8 \pm 130.4$	$< 0.0001$
Median	810.5	440.0	
Salivary cortisol			
Basal values (nmol/L)	$21.1 \pm 19.0$	$13.0 \pm 5.3$	NS
Median	16.0	11.0	
Post-synacthen values (nmol/L)	$79.9 \pm 34.8$	$45.7 \pm 13.9$	0.0021
Median	77.0	46.0	
Serum-free cortisol			
Basal values (nmol/L)	$56.6 \pm 40.2$	$35.9 \pm 18.2$	NS
Median	42.5	31.5	
Post-synacthen values (nmol/L)	$158.4 \pm 69.1$	$98.1 \pm 24.9$	0.0008
Median	138.0	108.0	
Number of cases of sepsis (%)	27 (23.2%)	3 (33.3%)	NS
Number of deaths (%)	26 (22.4%)	3 (33.3%)	NS

Quantitative values are means  $\pm$  standard deviation.

Within-group comparison was performed after Bonferroni correction,  $P < 0.006$ .

All cortisol values are expressed in nmol/L ( $1 \mu\text{g/dl} = 27.6 \text{ nmol/L}$ ).

**Table 5.** Dichotomous variables influencing the outcome in two models of multivariable logistic regression using the model for end-stage liver disease score (a) and the Child-Pugh score (b)

Variables	Odds ratio	95% CI	P
<b>a</b>			
MELD score $\geq 24$	9.99	3.17–31.44	$< 0.0001$
Baseline serum-free cortisol concentrations $\geq 64.5$ nmol/L	2.31	0.77–6.94	0.13
Age $\geq 64$ years	4.36	1.42–13.32	0.009
<b>b</b>			
Child-Pugh score $\geq 9$	10.74	2.87–40.22	0.0004
Baseline serum-free cortisol concentrations $\geq 64.5$ nmol/L	2.10	0.74–5.96	0.16
Age $\geq 64$ years	2.80	0.99–7.89	0.0503

Only variables with a  $P$  value  $< 0.2$  in univariate analysis were entered in the logistic regression.  $T_0$  cortisol salivary concentrations were not taken into account since their close correlation with  $T_0$  serum-free cortisol concentrations.

CI, confidence interval; MELD, model for end-stage liver disease.

for the severity of the illness of a patient. This new concept occurs as a result of either a decrease in glucocorticoid production or a tissue resistance to glucocorticoids. Such a condition, described in critically ill patients, may also occur in our cirrhotic patients. Assessing glucocorticoid activity at tissue level is difficult, because several steps may modify it: changes in serum-free concentrations,



11- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity, glucocorticoid receptor concentrations and binding affinity and glucocorticoid receptor translocation (19).

Serum-free cortisol dosage is costly and time-consuming, and results are usually delayed and unsuitable for guiding acute clinical decisions. Therefore, attempts have been made to obtain information on free cortisol indirectly (6, 13, 20–22) or directly, by analysing urine or saliva (23). A well-designed study aimed at comparing total and free cortisol under basal and post-SST conditions evaluated the use of Coolens formula in patients with septic shock or sepsis and in healthy controls (13). In this study, Coolens formula proved to be a reliable predictor of measured free cortisol even though some patients were hypoalbuminaemic (13). However, this formula considerably simplifies the contribution of cortisol binding albumin (22) and consequently is probably not suitable to estimate serum-free cortisol in cirrhotic patients.

We present the first study comparing salivary cortisol concentrations with serum total cortisol and above all serum-free cortisol in a large group of cirrhotic patients. Salivary cortisol concentrations increase concurrently with the deterioration of liver function and further increase under septic conditions. Determining salivary cortisol concentrations is an easier, non-invasive and more reliable alternative approach for measuring serum-free cortisol concentrations, as cortisol concentrations in saliva are in equilibrium and correlate well with free cortisol concentrations (23). In our study, salivary cortisol concentrations were also closely correlated with serum-free cortisol concentrations (in the whole population, Spearman coefficient at  $T_0$ :  $r = 0.69$ ;  $P < 0.0001$ ), implying that salivary cortisol may be a useful surrogate marker of free cortisol. Our laboratory provided only a basal lower cut-off value for salivary cortisol, which classified 3.2% of our Child–Pugh C patients as having low cortisol concentrations. Results issued from different studies must be interpreted cautiously, as wide variations in normal values are observed between laboratories using different assays or even between laboratories using the same technique (24). As there is currently no available standardized assay to measure salivary cortisol, but only 'home-made' assays, it is mandatory for each laboratory to establish its own reference value. It should also be borne in mind that most commercial laboratory reference ranges are developed from healthy volunteer samples and generally do not account for age, gender or specific medical conditions such as cirrhosis. Furthermore, the salivary gland has abundant 11  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity which converts cortisol into cortisone. Another weakness of our work is the lack of appropriate control groups such as patients with well-documented adrenal dysfunction or healthy volunteers with normal CBG and albumin concentrations. Despite its association with death without liver transplantation in univariate analysis, baseline serum-free cortisol concentration was not statistically significant in the multivariate analysis probably because this study was not designed to

explore this interesting association. The higher serum-free cortisol concentrations in non-survivors probably reflect the systemic inflammation usually observed in the sickest cirrhotic patients, which is frequently caused by overt or occult infection (25, 26). Several studies have demonstrated a high incidence of bactDNA translocation in advanced cirrhosis which was associated with increased serum and ascitic fluid concentrations of pro-inflammatory cytokines (27) which have been well-identified as important modulators of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during stress conditions (23).

Finally, this study firmly establishes the limitations of measuring serum total cortisol in cirrhotic patients, especially in those with end-stage liver disease, because a reduction in total cortisol better reflects a decrease in cortisol-bound proteins rather than a decrease in free cortisol. Testing salivary cortisol is an attractive approach for clinicians since the current methods available for the measurement of serum-free cortisol are cumbersome and not suitable for routine laboratory use. The main tasks of scientific societies and manufacturers will be to standardize assays to gain better comparability between published studies and to determine the method-specific reference ranges since inherent differences between assays may influence optimal diagnostic criteria in cirrhotic patients. Carrying out a well-designed study is also urgently required to determine the 'appropriate' serum-free cortisol concentration which should dictate supplementary glucocorticoid, thus affecting the clinical outcome. Pending further investigations in cirrhotic patients, we recommend initially implementing the standard 250  $\mu$ g SST, complemented by a salivary cortisol measurement each time the standard SST is subnormal in clinical conditions well-known to be associated with low cortisol-bound proteins, such as cirrhosis.

## Acknowledgements

We thank F. Leroux of the Clinical Investigation Centre for his technical assistance and Professor J. L. Schlienger for his advice.

**Competing interest:** We thank Novartis Pharma (France) for its partial financial support.

**Writing assistance:** Frances Sheppard has corrected the English in this manuscript without funding source.

**Funding:** Dr Thevenot received a grant (R/2008/34) for this CORTICIR study from The French Inter-regional Program for Clinical Research.

## References

1. Harry R, Auzinger G, Wendon J. The clinical importance of adrenal insufficiency in acute hepatic dysfunction. *Hepatology* 2002; **36**: 395–402.
2. Marik PE, Gayowski T, Starzl TE. The hepatoadrenal syndrome: a common yet unrecognized clinical condition. *Crit Care Med* 2005; **33**: 1254–9.

3. Fernandez J, Escorsell A, Zabalza M, *et al.* Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis and septic shock: effect of treatment with hydrocortisone on survival. *Hepatology* 2006; **44**: 1288–95.
4. Tsai MH, Peng YS, Chen YC, *et al.* Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis, severe sepsis and septic shock. *Hepatology* 2006; **43**: 673–81.
5. Thierry S, Giroux Leprieur E, Lecuyer L, *et al.* Echocardiographic features, mortality, and adrenal function in patients with cirrhosis and septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; **52**: 45–51.
6. Galbois A, Rudler M, Massard J, *et al.* Assessment of adrenal function in cirrhotic patients: salivary cortisol should be preferred. *J Hepatol* 2010; **52**: 839–45.
7. Cooper MS, Stewart PM. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N Engl J Med* 2003; **348**: 727–34.
8. Hamrahian AH, Oseni TS, Arafah BM. Measurements of serum free cortisol in critically ill patients. *N Engl J Med* 2004; **350**: 1629–38.
9. Arafah BM, Nishiyama FJ, Tlaygeh H, Hejal R. Measurement of salivary cortisol concentration in the assessment of adrenal function in critically ill subjects: a surrogate marker of the circulating free cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**: 2965–71.
10. Bosch J, Thabut D, Albillos A, *et al.* Recombinant factor VIIa for variceal bleeding in patients with advanced cirrhosis: a randomized, controlled trial. *Hepatology* 2008; **47**: 1604–14.
11. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; **20**: 864–74.
12. Zietz B, Lock G, Plach B, *et al.* Dysfunction of the hypothalamic-pituitary-glandular axes and relation to Child-Pugh classification in male patients with alcoholic and virus-related cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; **15**: 495–501.
13. Ho JT, Al-Musalhi H, Chapman MJ, *et al.* Septic shock and sepsis: a comparison of total and free plasma cortisol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 105–14.
14. Orbach O, Schussler GC. Increased serum cortisol binding in chronic active hepatitis. *Am J Med* 1989; **86**: 39–42.
15. Oelkers W. Adrenal insufficiency. *N Engl J Med* 1996; **335**: 1206–12.
16. Marik PE, Pastores SM, Annane D, *et al.* Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med* 2008; **36**: 1937–49.
17. Annane D, Sebille V, Charpentier C, *et al.* Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002; **288**: 862–71.
18. Sprung CL, Annane D, Keh D, *et al.* Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* 2008; **358**: 111–24.
19. Annetta M, Maviglia R, Proietti R, Antonelli M. Use of corticosteroids in critically ill septic patients: a review of mechanisms of adrenal insufficiency in sepsis and treatment. *Curr Drug Targets* 2009; **10**: 887–94.
20. Le Roux CW, Chapman GA, Kong WM, *et al.* Free cortisol index is better than serum total cortisol in determining hypothalamic-pituitary-adrenal status in patients undergoing surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 2045–8.
21. Coolens J, Baelen HV, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem* 1987; **26**: 197–202.
22. Dorin RI, Pai HK, Ho JT, *et al.* Validation of a simple method of estimating plasma free cortisol: role of cortisol binding to albumin. *Clin Biochem* 2009; **42**: 64–71.
23. Arafah BM. Hypothalamic pituitary adrenal function during critical illness: limitations of current assessment methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; **91**: 3725–45.
24. Nunes ML, Vattaut S, Corcuff JB, *et al.* Late-night salivary cortisol for diagnosis of overt and subclinical Cushing's syndrome in hospitalized and ambulatory patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**: 456–62.
25. Thabut D, Massard J, Gangloff A, *et al.* Model for end-stage liver disease score and systemic inflammatory response are major prognostic factors in patients with cirrhosis and acute functional renal failure. *Hepatology* 2007; **46**: 1872–82.
26. Zapater P, Francés R, González-Navajas JM, *et al.* Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology* 2008; **48**: 1924–31.
27. Francés R, Zapater P, González-Navajas JM, *et al.* Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2008; **47**: 978–85.

## **Position du problème**

La fonction surrénalienne a été peu étudiée chez le patient cirrhotique « stable » ou au cours du stress (comme le sepsis). Pourtant, le déficit absolu ou relatif en cortisol pourrait aggraver l'hypertension portale en ne permettant plus la vasoconstriction artérielle associée aux catécholamines.

Les études antérieures récentes réalisées chez les sujets cirrhotiques stables hémodynamiquement ou en situation de stress (allant du sepsis au choc septique) montrent une prévalence élevée de dysfonction surrénale, caractérisée par une production inadéquate de cortisol en réponse au stress. Le dépistage de l'insuffisance surrénale se fait habituellement par un test au Synacthène® dosé à 250 µg avec mesure sérique du cortisol total avant et 1 heure après le test. La principale critique de ce dépistage réalisé chez le cirrhotique est son manque de fiabilité. En effet, près de 90% du cortisol est lié (forme inactive) à la CBG et à l'albumine dont les taux sériques sont généralement abaissés chez le cirrhotique. Le dosage du cortisol total ne peut donc pas être correctement interprété en cas de baisse importante des concentrations sériques de ces protéines de transport. Notre hypothèse était que seule la fraction libre du cortisol (5-10% du cortisol total) mériterait d'être dosée chez ces patients pour éviter de porter abusivement un diagnostic d'insuffisance surrénale. Le dosage par ultrafiltration du cortisol libre est la méthode de référence mais ne peut pas être utilisé en routine du fait de son coût et du temps humain requis pour cette technique ; il pourrait être remplacé avantageusement par la mesure du cortisol libre dans la salive, méthode simple, non traumatique et largement utilisée dans l'évaluation de la maladie de Cushing. Ainsi, le dépistage de l'insuffisance surrénale par la mesure du cortisol libre pourrait permettre, à l'avenir, d'authentifier les vrais patients ayant une insuffisance surrénale et d'éviter des traitements substitutifs inutiles par hydrocortisone.

## **Elaboration de la recherche**

Nous avons réalisé une étude pilote prospective multicentrique (Besançon, Strasbourg, Vesoul et Dijon), financée par un programme hospitalier de recherche clinique interrégional, pour évaluer les effets de la baisse des protéines sériques liées au cortisol sur les concentrations sériques du cortisol total, du cortisol libre sérique et du cortisol salivaire chez des patients cirrhotiques hémodynamiquement stables et atteints de sepsis. Cent vingt-cinq patients cirrhotiques ont été inclus dans l'étude : 95 patients non infectés (34 patients classés Child-Pugh A, 29 B et 32 C) et 30 patients infectés (Child-Pugh > 8). Etaient exclus de cette étude, les patients ayant reçu des corticoïdes dans les 6 mois ou des traitements interférant avec le métabolisme du cortisol (oestrogènes, kétoconazole), les



patients atteints de candidose orale, d'hémorragie digestive et de choc septique. Les patients ayant une infection prouvée ou suspectée associée à un SRIS avaient par définition un sepsis [1]. Le dosage du cortisol libre était réalisé par ultrafiltration (méthode de référence réalisée dans le Laboratoire d'explorations fonctionnelles par les isotopes, hôpital civil de Strasbourg) et par le recueil de la salive (salivette Sarstedt®) avec dosage du cortisol libre par une méthode radioimmunologique [88]. Du fait de l'existence de deux tests au Synacthène® disponibles et dosés à 250 µg et à 1 µg, chaque patient a eu successivement à 24 heures d'intervalle d'abord le test à 1 µg puis à 250 µg. Il faut également noter que ce type de comparaison avec les deux tests au Synacthène® dosés à 1 µg puis à 250 µg, comme cela est habituel dans les études cliniques [4, 198, 271] où l'intervalle minimal de temps recommandé entre ces deux tests doit être supérieur à 4 heures [271]. Le test dosé à 1 µg aurait une meilleure sensibilité pour dépister une insuffisance surrénale. Nous avons comparé les concentrations du cortisol salivaire et du cortisol libre sérique en fonction du cortisol total post-Synacthène censé discriminer les sujets insuffisants surrénaliens (cortisol total à T60 < 510 nmol/L) et les sujets indemnes de dysfonction surrénale (cortisol total à T60 ≥ 510 nmol/L).

### **Analyse statistique**

Pour étudier la relation entre les concentrations du cortisol total et du cortisol libre sérique dans chaque groupe (Child-Pugh A, B, C et patients septiques classés Child-Pugh > 8), nous avons utilisé un modèle de régression linéaire ; les droites de régression étaient comparées entre elles par une analyse de covariance (l'homogénéité des variances avaient été testée au préalable). Du fait de l'absence de perdu de vue, nous avons effectué une analyse en régression logistique, univariée puis multivariée, pour identifier les variables d'intérêt pouvant prédire le décès sans transplantation hépatique. Les variables quantitatives étaient dichotomisées selon le meilleur seuil discriminant (obtenu par des courbes ROC) pour discriminer les patients décédés et survivants.

### **Résultats**

Notre cohorte se composait essentiellement d'hommes (69%) âgés de 58±10 ans et la cause de la cirrhose était principalement alcoolique (84%).

Les effets de l'insuffisance hépatique des 95 patients sans sepsis sur les concentrations du cortisol étaient sans équivoque : plus la fonction hépatique était altérée, plus on observait une baisse significative des concentrations du cortisol total alors que les

concentrations du cortisol libre sérique et du cortisol salivaire augmentaient (**Figure 1** de l'article).

On notait une chute significative des concentrations du cortisol total chez les patients ayant des concentrations basses d'albumine ( $\leq 25$  g/L) et de CBG ( $\leq 35$  mg/L) par rapport aux patients ayant des protéines porteuses du cortisol normales ou subnormales, alors même que les concentrations du cortisol libre sérique et du cortisol salivaire ne variaient pas significativement.

L'analyse de covariance (**Figure 2** de l'article) montrait que les droites de régression entre les quatre groupes différaient significativement ( $P < 0,0001$ ) ; en effet, les patients Child-Pugh A avaient une relation entre le cortisol total et le cortisol libre différente de celle observée dans les autres groupes. A niveau égal de cortisol total, les concentrations du cortisol libre étaient significativement plus élevées dans le groupe Child-Pugh C que Child-Pugh B ( $P = 0,025$ ) ou Child-Pugh A ( $P < 0,0001$ ).

Le suivi moyen de cette cohorte était de  $10 \pm 6$  mois et 29 patients (23,2%) sont décédés en  $3 \pm 3$  mois. Les causes du décès étaient habituelles dans 24 cas (13 sepsis, 8 insuffisances hépatiques terminales, 2 hémorragies digestives, un cancer de l'œsophage) et indéterminées pour 4 patients. Huit patients ont été transplantés, dont un est décédé en post-greffe.

Lorsqu'on étudiait les 117 patients non transplantés, les variables suivantes différaient significativement entre les survivants ( $n=89$ ) et les patients décédés ( $n=28$ ). De façon attendue, les scores initiaux de Child-Pugh et de MELD étaient plus élevés chez les patients décédés. En revanche et contrairement à l'idée majoritairement répandue dans la littérature, les concentrations du cortisol libre sérique à T0 étaient plus élevées chez les patients décédés avec un seuil prédictif mesuré à 64 nmol/L (ce chiffre a été déterminé par une courbe ROC). En analyse multivariée, les scores de Child-Pugh et du MELD conservaient leur significativité mais pas le cortisol libre sérique.

## **Conclusion**

Le résultat principal de cette étude pilote a été la confirmation que les concentrations du cortisol total sérique diminuent avec la gravité de l'insuffisance hépatique, évaluée ici par le score de Child-Pugh, et la baisse concomitante des protéines porteuses du cortisol (albumine et CBG). La prévalence de la dysfonction surrénale, mesurée avec le cortisol total, était plus faible dans notre étude (7,2%) et restreinte aux patients Child C (14,5%). Cette plus faible prévalence de dysfonction surrénale peut être liée au fait que les patients inclus dans cette étude avaient globalement une meilleure fonction hépatique que dans les autres études. De façon intéressante, nous avons montré que la fonction surrénale restait

préservée, malgré la baisse du cortisol total, puisque les concentrations du cortisol libre sérique et du cortisol salivaire chez les patients avec et sans « dysfonction surrénale » étaient peu différentes.

### **3.7) Article 7**

**Thevenot T**, Dorin RI, Qualls C, Sapin R, Grandclement E, Borot S, Weil D, Degand T, Monnet E, Di Martino V, Kazlauskaite R.

Higher serum free cortisol levels predict mortality in  
haemodinamically stable cirrhotic patients

Article soumis à la revue *Journal of Hepatology*.

## HIGHER SERUM FREE CORTISOL LEVELS PREDICT MORTALITY IN HEMODYNAMICALLY STABLE CIRRHOTIC PATIENTS

Thierry THEVENOT (1,2), Richard DORIN (3), Clifford R. QUALLS (4), Remy SAPIN (5),  
Emilie GRANDCLEMENT (6), Sophie BOROT (7), Frances SHEPPARD (8), Delphine WEIL  
(1), Thibault DEGAND (1) Elisabeth MONNET (1,2), Vincent DI MARTINO (1,2), Rasa  
KAZLAUSKAITE (9)

(1) Service d'Hépatologie et de Soins Intensifs Digestifs, Hôpital Jean Minjoz, 25030 Besançon cedex, France, (2) EA UPRES 3186 « Agents Pathogènes et Inflammation » de l'Université de Franche-Comté, 25030 Besançon cedex, France, (3) Department of Medicine, New Mexico VA Medical Center and University of New Mexico Health Science Center, USA, (4) Clinical Translational Science Center, University of New Mexico Health Science Center, USA, (5) Service d'Exploration Fonctionnelle par les Isotopes, 1 place de l'Hôpital, Hôpital civil de Strasbourg. F-67091 Strasbourg Cedex, France, (6) Service de Biochimie Hormonale, Hôpital Jean Minjoz, 25030 Besançon cedex, France, (7) Service d'Endocrinologie-Métabolisme et Diabétologie-Nutrition, Hôpital Jean Minjoz, 25030 Besançon cedex, France, (8) Clinical Investigation Centre, Hôpital Saint Jacques, 25030 Besançon cedex, France, (9) Departments of Preventive Medicine and Internal Medicine, Rush University Medical Center 1700 W. Van Buren Street, Suite 470, Chicago, IL, USA.

**Short title:** Adrenal insufficiency and cirrhosis.

**Key words:** adrenal insufficiency; cortisol; cirrhosis.

**Counts:** Abstract: 242 words. Text + references + figures + tables: 4993 words. References: 27, Figures: 3, Tables: 4.

**Funding:** Dr Thévenot received a grant (R/2008/34) for this study from The French Inter-regional Program for Clinical Research

**Abbreviations:** AI, adrenal insufficiency; CBG, corticosteroid-binding globulin; FCI, free cortisol index; HPA, hypothalamic-pituitary adrenal; HSD, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase; LD-SST, low-dose SST; SD-SST, standard-dose SST; SST, short synacthen test; SFC, serum free cortisol; STC, serum total cortisol.

**Competing Interest:** We thank Novartis Pharma (Rueil Malmaison, France) for its partial financial support.

**Disclosures:** No conflicts of interest exist.

**Correspondence to:** Doctor THEVENOT Thierry, Service d'Hépatologie et de Soins Intensifs Digestifs, Hôpital Jean Minjoz, 25000 Besançon, France.

**Tel:** 33 3 81 66 85 94, **FAX:** 33 3 81 66 84 18, **E-mail:** [thevenot@chu-besancon.fr](mailto:thevenot@chu-besancon.fr)

## ABSTRACT

**Background&Aims:** (1) to explore measured serum and estimated free cortisol after the low-dose 1 µg short synacthen test (LD-SST) in the setting of liver cirrhosis; (2) to explore serum free cortisol after LD-SST as a predictor of one-year non-transplant related mortality.

**Methods:** We assessed basal ( $T_0$ ) and post-synacthen ( $T_{30}$ ) serum total and free cortisol in 95 consecutive stable cirrhotic patients. The estimated serum free cortisol using Coolens and cubic formula was validated with measured cortisol. Patients were followed for at least 12 months to assess non-transplant related mortality.

**Results:** Child-Pugh C cirrhotic patients had slightly non-significantly higher basal free cortisol and stimulated free cortisol compared to Child-Pugh A and B, regardless of cortisol-binding protein concentrations. Coolens' equation underestimated free cortisol (45% bias;  $P<0.001$ ) especially in patients with low albumin levels, unlike Dorins' cubic solution (-4% bias;  $P=0.14$ ). False-positive rates were up to 9% and 33% using LD-SST stimulated free cortisol and total cortisol thresholds under 50 nmol/L and 440 nmol/L, respectively.  $T_{30}$  serum free cortisol above 79 nmol/L predicted mortality in a multivariate analysis, independently of cirrhosis severity and low albumin.

**Conclusions:** Hemodynamically stable cirrhotic patients have no functional adrenal insufficiency unlike acutely ill patients. Supporting this hypothesis, the likelihood of non-transplant related mortality was higher in patients with higher stimulated free cortisol levels. The prevalence of false-positive LD-SST is high, highlighting the limitations of functional testing in cirrhotic patients without suspected adrenal disease, and warrants judicious use of functional adrenal testing.

**Key words:** adrenal insufficiency; cortisol; cirrhosis.

1 Few studies assessing adrenal function in cirrhotic patients [1-6] suggest that adrenal  
2 dysfunction is frequent, especially in patients with septic shock [5]. Assessing adrenal  
3 reserve in cirrhotic patients is challenging. The conventional standard-dose short synacthen  
4 test (SD-SST), which measures serum total cortisol (STC) before and 60 minutes after an i.v.  
5 injection of 250 µg of synacthen, is recommended for diagnosing adrenal insufficiency (AI) in  
6 critically ill patients [7]. As stimulation with 250 µg of synacthen is supraphysiological, a low  
7 dose of 1 µg SST (LD-SST) may be better than an SD-SST in hypothalamic-pituitary adrenal  
8 (HPA) insufficiency diagnosis in patients without liver disease [8]. However, standard  
9 diagnostic thresholds of stimulated STC may not apply to cirrhotic patients with severe liver  
10 function impairment [9].

11 Most studies assessing adrenal function in cirrhotic patients are based on STC  
12 concentration, which consists of the physiologically active serum free cortisol (SFC) fraction  
13 [10] and the protein-bound cortisol fraction: more than 90% of circulating cortisol is bound to  
14 corticosteroid-binding globulin (CBG) and albumin, proteins synthesized in the liver and  
15 frequently reduced in advanced cirrhosis. Using SD-SST testing, we recently demonstrated  
16 that the reduced serum concentrations of CBG and albumin translated into a decrease in  
17 STC concentrations alongside the alteration of hepatic function without altering the free  
18 biologically active hormone [9]. The limitations of STC have triggered a growing interest in  
19 measuring the free cortisol fraction (in serum or saliva) as a more appropriate marker of  
20 adrenal status in cirrhotic patients. SFC cannot currently be obtained routinely, but simpler  
21 estimates are proposed [11,12].

22 In the present study involving a well-characterized cohort of cirrhotic subjects without  
23 symptoms of adrenal disease, we aimed to assess: 1) the variations of STC and SFC  
24 concentrations using the LD-SST along the spectrum of cirrhosis severity, 2) the agreement  
25 between estimated SFC using Coolens' or cubic equations and measured SFC [11,12], 3)  
26 false-positive rates using previously suggested thresholds to diagnose AI, and 4) the cortisol  
27 levels predicting non-transplant related mortality on longitudinal follow up.



## METHODS

### Study design and patient characteristics

This study was conducted in the Hepatology Unit at Besançon University Hospital between June 2008 and June 2009 with the approval of the local ethics committee. We prospectively enrolled 125 cirrhotic patients (30 were septic) in whom results of the SD-SST have recently been reported elsewhere [9]. In the absence of a consensus to define the best approach of adrenal function assessment, an LD-SST and an SD-SST were performed at 24-hour interval after an overnight bed rest. The LD-SST was performed the day after admission and the SD-SST the following day.

To investigate the performance of LD-SST, we analyzed only the 95 hemodynamically stable patients (34 Child-Pugh A, 29B and 32C) hospitalized for a routine check-up of their cirrhosis. Inclusion and exclusion criteria have been reported elsewhere [9]. None of our stable patients had clinical evidence or suspicion of AI. Liver failure severity was established at admission by the Child-Pugh and MELD scores.

For the prospective cohort study, we documented non-transplant related mortality in our 95 patients until February 17, 2010, i.e. one year after the last inclusion. Cases of undetermined vital status at the end of the study were resolved by questioning family physicians.

### Laboratory measurements

The LD-SST was prepared by diluting the entire contents of an ampoule (250 µg/ml) with tetracosactrin (synacthen®, Novartis Pharma SAS, Rueil-Malmaison, France) to 250 ml of sterile 0.9% NaCl solution. One milliliter of this solution, corresponding to 1 µg of synacthen, was administered intravenously without tubing. STC and SFC concentrations were measured before ( $T_0$ : between 8:00 and 9:00 hours) and 30 minutes ( $T_{30}$ ) after the intravenous injection. Patients were not allowed to smoke, drink liquids or brush their teeth 60 minutes before the LD-SST and they remained recumbent throughout the test. Details of measurements of STC, SFC, serum albumin and CBG concentrations are reported elsewhere [9]. Serum albumin was classed as subnormal ( $>25$  g/L) or low ( $\leq 25$  g/L), using



previously described cutpoints [13]. Serum CBG concentration was dichotomized into normal (>35 g/L) or low (≤35 g/L) according to the lower limit of our laboratory reference range.

### Assessment of adrenal reserve

We evaluated the cortisol testing thresholds for false-positive rates in patients without established adrenal disease. Moreover, none had hypotension or shock on follow up.

Total cortisol. The following thresholds were evaluated to assess the false-positive rates: (i) basal STC <138 nmol/L and 138–365 nmol/L [8], (ii) SD-SST T<sub>60</sub> STC ≤510 nmol/L (18.5 µg/dL), the standard SD-SST threshold, [11,13], (iii) cortisol increment after SD-SST stimulation <248 nmol/L, according to the *critical illness-related corticosteroid insufficiency* (CIRCI) criteria [7], (iv) LD-SST T<sub>30</sub> STC <440 nmol/L (16 µg/dL), as suggested by a recent meta-analysis [8].

Serum free cortisol. The following thresholds were evaluated to assess the false-positive rates: (i) basal SFC <50 nmol/L [14], (ii) SD-SST stimulated SFC <85 nmol/L, referring to supraphysiological stimulation of adrenal cortisol secretion [13], and (iii) LD-SST stimulated SFC <50 nmol/L, referring to the physiological sub-maximal cortisol response [14].

### Calculated serum free cortisol

We compared the measured SFC concentrations with 1) the Coolens' equation [11] derived from STC and CBG concentrations, 2) the cubic (Dorin') solution [12], based on mass action equations that account for individual, measured concentrations of both CBG and albumin. To optimize the cubic solution, we used an iterative non-linear maximum likelihood method to minimize the squared percentage deviations between the cubic fit and measured SFC, which yielded an equilibrium dissociation constant for cortisol binding to CBG ( $K_C$ ) and albumin ( $K_A$ ) of 95 nmol/L and 233.7 nmol/L, respectively.

### Statistical analysis

Numerical variables were presented as mean±SD and categorical variables as percentages. We analyzed the effect of the severity of liver insufficiency on SFC and STC, as well as the influence of albumin and CBG concentrations on STC and SFC values using the Kruskal-

Wallis test. The strength of agreement between measured and calculated SFC was analyzed using the Bland-Altman method. Potential independent predictors of death without liver transplantation were compared between survivors and nonsurvivors at 12 months using the Wilcoxon rank-sum test. Variables with a P-value <0.2 were dichotomized for best discrimination between survivors and nonsurvivors by the construction of ROC curves. Predictors were then entered into a stepwise variable selection procedure by multivariate logistic regression with a backward approach (a significance level of 0.2 to retain variables in the model was used). Due to collinearity of Child-Pugh and MELD scores, separate multivariable logistic regression models were created to predict mortality without liver transplantation. Logistic regression was used, as complete follow-up data were available for all patients. Predictors with a P-value <0.05 were retained. We illustrated the significant effect of prognostic variables on outcome by calculating the survival rate with the Kaplan-Meier method. All analyses were performed using SAS version 9.1 for Windows (Institute, Inc., Cary, NC, USA).

## Results

### Clinical characteristics of patients

Table 1 describes characteristics of our patients. Patient characteristics stratified by Child-Pugh class have been reported elsewhere [9]. The etiology of cirrhosis, proportion of active drinkers, age and gender distribution was not significantly different in patients with Child-Pugh A, B and C.

### Cirrhosis severity and cortisol levels

Table 2 describes the differences in STC and SFC concentrations, stratified by severity of liver cirrhosis.

**Serum total cortisol.** The mean values of T<sub>0</sub> and T<sub>30</sub> STC concentrations were 25% lower in Child-Pugh C compared with Child-Pugh A patients. The differences in STC concentrations

1 were associated with lower albumin and CBG concentrations, particularly in patients with  
2 Child-Pugh C cirrhosis. T<sub>0</sub> STC concentrations were lower (P<0.001) in patients with (a) low  
3 serum albumin (333±192 nmol/L) compared to those with subnormal albumin (387±195  
4 nmol/L), and with (b) low serum CBG (298±165 nmol/L) compared to those with subnormal  
5 CBG (450±198 nmol/L).  
6  
7  
8  
9

10 **Serum free cortisol.** SFC concentrations at T<sub>0</sub> and T<sub>30</sub> were progressively higher from Child-  
11 Pugh A through C, in common with our previous findings using SD-SST testing [9].  
12 Compared to Child-Pugh A and B, child-Pugh C patients had slightly higher basal SFC  
13 (57.8±40.2 vs 42.4±26.5 nmol/L; P=0.06) and stimulated SFC (124.4±72.7 vs 91.6±34.6  
14 nmol/L; P=0.07), regardless of cortisol-binding protein concentrations. The calculated mean  
15 free cortisol fraction (expressed as a percent of total cortisol) varied significantly depending  
16 on cirrhosis severity with a larger free cortisol fraction in Child Pugh C at T<sub>0</sub> (Child-Pugh A:  
17 9±3% vs Child-Pugh C: 19±8%; P<0.0001) and at T<sub>30</sub> (Child-Pugh A: 13±3% vs Child-Pugh  
18 C: 23±8%; P<0.0001). As expected, SFC concentrations were similar and independent of  
19 serum albumin or CBG concentrations, through Child-Pugh A through C (Figure 1).  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

### 35 **False-positive rates in patients with subnormal albumin/CBG concentrations**

36  
37  
38 False-positive rates of T<sub>30</sub> STC concentrations based on published thresholds are presented  
39 in Table 3.  
40  
41

42  
43 Baseline STC concentrations yielded similar false-positive rates (<5%) in normo-proteinemic  
44 (CBG and albumin) patients, as in the general population [8]. However, false-positive rates  
45 were more than twice as high in patients with low albumin concentrations. More than 60% of  
46 patients had basal SFC concentrations ≤50 nmol/L, suggesting that too high a proportion of  
47 patients without adrenal disease would be subjected to further testing if this threshold is used  
48 indiscriminately as a screening test for AI.  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55

56  
57 LD-SST stimulated SFC <50 nmol/L threshold is based on physiological sub-maximal cortisol  
58 response as previously described in critically ill patients [14]. In addition, we found that free  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

cortisol values <49 nmol/L corresponds to the 5<sup>th</sup> percentile (specificity of 95%) of the LD-SST T<sub>30</sub> free cortisol distribution. Using a specificity of 90%, the cut score would be 56 nmol/L.

The false-positive rates of STC (T<sub>30</sub>) after LD-SST in patients with subnormal proteins were similar to those in other populations [8]. SFC concentration at T<sub>30</sub> after LD-SST of <50 nmol/L had similar low false positive rates as T<sub>60</sub> after SD-SST of <85 nmol/L in both, patients with low and subnormal CBG or albumin (Table 3).

### **Comparison of cubic and quadratic (Coolens) equations for prediction of measured free cortisol**

**Figure 2A** depicts Bland-Altman plot, showing that the Coolens' equation underestimates SFC, with significant 45%±35 mean bias (P<0.001), and 58% variability (a root mean squared error). Coolens' percent error was negatively correlated with serum albumin concentration (r=-0.15, P=0.04), indicating that the inaccuracy of free cortisol assessed using Coolens' equation is greater in subjects with low serum albumin.

**Figure 2B** depicts the Bland-Altman plot for the cubic solution. There was no evident bias (-4%±33), which was non-significant compared to no bias (P=0.14). The variability in free cortisol estimated using a cubic solution yielded a root mean squared error of 33%. There was no correlation between percent error and serum albumin concentration. The cubic solution [12] was therefore more accurate and precise in estimating SFC concentrations than Coolens' equation.

### **Serum free cortisol as a predictor of mortality**

During the mean follow-up of 15.9±6.5 months, 90 patients did not receive a liver transplant. Seventeen (19%) of them died within a mean time frame of 3.6±2.8 months after their adrenal evaluation. Causes of death without liver transplantation were sepsis-related (n=7),



1 end-stage liver failure (n=4), bleeding-related (n=1), oesophageal cancer (n=1), and  
2 unknown in 4 other patients. Compared to survivors (n=73), the deceased patients had  
3 significantly higher Child-Pugh and MELD score, higher INR, higher total bilirubin, lower  
4 albumin and lower HDL cholesterol, while age, creatinine and total cholesterol were not  
5 significantly different (Table 1).  
6

7  
8 We found significantly higher T<sub>30</sub> SFC concentrations (129±67 vs. 94±41 nmol/L; P=0.02)  
9 and lower CBG concentrations (29±9 vs. 39±14 mg/L; P=0.007) in the deceased patients  
10 compared to the survivors. The baseline and T<sub>30</sub> cortisol levels (free and total) after LD-SST  
11 were not significantly different in survivors and deceased patients. Predicting non-transplant  
12 related mortality, the area under ROC curve for LD-SST-stimulated T<sub>30</sub> SFC was 0.69  
13 (95%CI 0.56-0.83), compared to AUC=0.61 (95%CI 0.44-0.77) for T<sub>60</sub> SFC after SD-SST.  
14 The discriminatory capacity of SD-SST was similar to that of T<sub>0</sub> SFC AUC=0.61 (0.45-0.77).  
15 LD-SST-stimulated T<sub>30</sub> SFC concentrations <79 nmol/L were associated with a low likelihood  
16 of dying (likelihood ratio =0.14), whereas patients with SFC >178 nmol/L were twice as likely  
17 to die. In multivariable models for predicting mortality without liver transplantation, high SFC  
18 concentration after LD-SST was a significant predictor of death, independently of low serum  
19 albumin concentration and Child-Pugh or MELD scores (Table 4a and 4b). Figure 3 depicts  
20 the survival analysis in patients who had T<sub>30</sub> SFC >79 nmol/L (n=59) and < 79 nmol/L (n=31).  
21 The survival was worse in patients with SFC ≥79 nmol/L at T<sub>30</sub> after LD-SST.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

## 44 DISCUSSION

45  
46 Our study is the largest assessing adrenal responsiveness using SFC in patients with liver  
47 cirrhosis. The principal findings were (1) SFC levels after LD-SST stimulation were similar  
48 along the spectrum of liver cirrhosis; (2) SFC levels were directly associated with the  
49 likelihood of non-transplant related mortality in clinically stable cirrhotic patients who have no  
50 established adrenal disease.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Our principal findings challenge the recently introduced concept of “hepatoadrenal  
2 syndrome” [15]. Our data suggest that functional AI described in critically ill patients is not  
3 typically observed in stable chronic hepatic insufficiency. However, the SFC response to  
4 lower synacthen doses (LD-SST) tends to be higher when protein synthesis is more severely  
5 impaired in our hemodynamically stable patients. This tendency was also observed during  
6 the SD-SST. Likewise, stimulated SFC was directly proportionate to the likelihood of mortality  
7 in patients who did not receive liver transplantation.  
8

9  
10 Several hypotheses may explain free cortisol hyper-responsiveness to synacthen in patients  
11 with more severe liver disease, many of whom have alcoholic cirrhosis. First, the higher T<sub>30</sub>  
12 SFC concentrations observed in nonsurvivors probably reflect the high degree of liver  
13 insufficiency typically associated with high concentrations of proinflammatory cytokines (IL-1,  
14 IL-6 and TNF- $\alpha$ ) and oxidative damage, affecting HPA axis [16]. The pro-inflammatory  
15 response may be related to liver Kupffer cells, liver disease *per se* (as in hepatitis C), or  
16 increased intestinal permeability to endotoxins caused by bacterial translocation [4, 14, 17],  
17 an event frequently observed in advanced cirrhosis and identified as a factor in detrimental  
18 outcome [18]. This systemic inflammation creates an “adrenal stress state” resulting in  
19 higher cortisol production, with a higher fraction of biologically active cortisol due to reduced  
20 CBG and albumin synthesis. Second, increasing cortisol levels may result from decreased  
21 cortisol clearance, a fault in inactivation of cortisol to cortisone due to deficiency of hepatic  
22 and renal 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) type 2 in alcoholism [19,20]. Third,  
23 non-adrenal cortisol production may contribute to higher cortisol levels, as long-term and  
24 short-term abstinence from alcohol results in significant induction of 11 $\beta$ -HSD type 1 gene  
25 expression and activity [21]. Higher SFC levels in advanced stages of liver cirrhosis may  
26 thus be related to increased cortisol production (adrenal and non-adrenal), coupled with  
27 reduced cortisol binding capacity due to low protein levels and faulty cortisol inactivation.  
28

29  
30 Our results differ from those published by Tan and colleagues, who were the first to  
31 investigate adrenal function with the SD-SST in 43 stable cirrhotic patients using measured  
32

1 SFC [4]. Using a peak SFC threshold <33 nmol/L, five cirrhotic patients (12%), and none of  
2 the 10 healthy controls were diagnosed with AI. The patients with low peak SFC had higher  
3 median MELD scores (19±3 vs 13±1; P=0.03) and a higher mortality rate (60% vs 5%;  
4 P=0.0007) compared to the remaining 38 cirrhotic patients with peak SFC concentrations  
5 >33 nmol/L. Tan's study has several limitations. First, a low SFC threshold was used,  
6 determined by relatively few patients and events. Second, one of the three reported deaths  
7 was post-liver transplantation and cannot be reliably attributed to low cortisol concentrations.  
8 Lastly, the study did not validate estimated SFC, and our data demonstrate that the Coolens'  
9 equation underestimates SFC in patients with severe liver cirrhosis and low albumin  
10 concentrations.  
11

12 Our study establishes that LD-SST elicits SFC responses in patients with liver cirrhosis that  
13 are highly correlated with SFC responses to SD-SST. LD-SST uses more physiological  
14 levels of corticotrophin stimulation than supra-physiological doses used in SD-SST.  
15 Regardless of the type of stimulation test, SFC concentrations in our patients were higher in  
16 Child-Pugh C patients compared to A and B, and were independent of the cortisol-binding  
17 protein concentrations, reflecting an adrenal stress response to a more severe illness. Yet  
18 lower STC concentrations in Child-Pugh C patients [9] were explained by the lower cortisol-  
19 binding protein and albumin. We conclude that STC concentrations in such patients are  
20 misleading, and should not be used in functional assessment of adrenal status of patients  
21 with advanced liver cirrhosis.  
22

23 Information about performance and interpretation of LD-SST in stable cirrhotic patients is  
24 scant. Only one study used LD-SST [1], calculating SFC using Coolens' equation [11] in a  
25 subgroup of 41 patients. It found that peak and delta calculated SFC using Coolens' formula  
26 were significantly reduced in the patient group suspected of having AI, although none of  
27 these patients exhibited a free cortisol index <12 (FCI, calculated as a cortisol concentration  
28 divided by CBG level), which is considered to be a threshold defining insufficient adrenal  
29 reserve [22]. These findings were supported by a recent study showing discrepancies in  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 diagnosis of AI using STC levels and FCI in patients with severe liver disease [23]. Both FCI  
2 and Coolens' equation oversimplify the contribution of cortisol binding proteins, as they do  
3 not account for low serum albumin levels [12]. Consequently, neither of these methods is  
4 suitable for estimating SFC in the sickest cirrhotic patients, who have severely impaired  
5 albumin synthesis as demonstrated in our study comparing Coolens' and cubic (Dorins')  
6 equations. However, Coolens' equation may work well in patients with septic shock or sepsis  
7 and in healthy controls, as demonstrated in a well-designed study aimed at comparing total  
8 and free cortisol under basal and post-SST conditions [24]. The heterogeneity of study  
9 subjects and assay methodologies may be responsible for such discrepancies between  
10 studies. Our study proves that Coolens' equation is inadequate for stable cirrhotic patients  
11 with severe hypoalbuminemia. We suggest using Dorins' equation, taking into account both  
12 CBG and albumin to measure SFC.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26  
27 The present study did not determine SFC thresholds for synacthen testing in our cirrhotic  
28 patients, as none had suspected or established AI. Nevertheless, we investigated false-  
29 positive rates for previously suggested SFC thresholds [14]. An SFC threshold <50 nmol/L  
30 after LD-SST shall be explored further in patients with suspected adrenal hypofunction.  
31 Suggested thresholds <50 nmol/L for LD-SST and <85 nmol/L for SD-SST had similar false-  
32 positive rates, implying that adrenal responsiveness is intact in patients with impaired protein  
33 synthesis. Both LD-SST and SD-SST can be used in hemodynamically stable cirrhotic  
34 patients if SFC is estimated or measured. Preparation and administration of LD-SST  
35 required a multi-step procedure that may contribute to the false post-SST results. A study  
36 performed in healthy volunteers showed a 20% proportion of false-positive results using LD-  
37 SST, attributed partly to ACTH loss during dilution or administration in intravenous infusion  
38 tubing [25]. This emphasizes the need to use the shortest possible length of tubing or to  
39 perform direct venous injection with the LD-SST. Some studies recommend measuring  
40 cortisol at 20-min and 30-min [26] because the use of a single 30-min endpoint may lead to  
41 higher rates of error. All testing in our study was performed by a nurse familiar with these  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

intricacies, and LD-SST was intravenously injected without tubing. Test preference should depend on the clinical question and ability to assure technical reliability [8]. False-positive rates of stimulated cortisol testing suggest that clinical suspicion should determine the patients to be tested.

Our prospective cohort study is the largest to assess SFC response to LD-SST in hemodynamically stable cirrhotic patients with varying degrees of liver insufficiency, but was not primarily designed to establish the SFC threshold for predicting death. A previous report also states that higher cortisol levels are associated with more severe illness and mortality on longitudinal follow up in 278 patients suffering from pneumonia [27]. Given the small number of events, the mortality findings in our study shall be explored in future studies.

In conclusion, high SFC concentrations predict worse outcomes independently of MELD or Child-Pugh scores and albumin, contrary to the “hepatoadrenal dysfunction” theory. High SFC concentrations may reflect increased cortisol production and decreased clearance which are usually due to systemic inflammation in cirrhotic patients. STC concentrations in advanced liver cirrhosis should not be used in LD-SST testing, and free cortisol index estimates must include both albumin and CBG concentrations. LD-SST with SFC testing may be considered in non-septic cirrhotic patients, but thresholds should be validated in patients at risk of HPA disease.

## REFERENCES

- [1] Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, Privitera G, Piro S, Rabuazzo AM, et al. Assessment of adrenocortical reserve in stable patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2010.
- [2] Fernandez J, Escorsell A, Zabalza M, Felipe V, Navasa M, Mas A, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis and septic shock: Effect of treatment with hydrocortisone on survival. *Hepatology* 2006;44:1288-95.
- [3] Galbois A, Rudler M, Massard J, Fulla Y, Bennani A, Bonnefont-Rousselot D, et al. Assessment of adrenal function in cirrhotic patients: salivary cortisol should be preferred. *J Hepatol* 2010;52:839-45.
- [4] Tan T, Chang L, Woodward A, McWhinney B, Galligan J, Macdonald GA, et al. Characterising adrenal function using directly measured plasma free cortisol in stable severe liver disease. *J Hepatol* 2010;53:841-8.
- [5] Thierry S, Giroux Leprieur E, Lecuyer L, Brocas E, Van de Louw A. Echocardiographic features, mortality, and adrenal function in patients with cirrhosis and septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008;52:45-51.
- [6] Tsai MH, Peng YS, Chen YC, Liu NJ, Ho YP, Fang JT, et al. Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis, severe sepsis and septic shock. *Hepatology* 2006;43:673-81.
- [7] Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Arlt W, et al. Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med* 2008;36:1937-49.
- [8] Kazlauskaitė R, Evans AT, Villabona CV, Abdu TA, Ambrosi B, Atkinson AB, et al. Corticotropin tests for hypothalamic-pituitary- adrenal insufficiency: a metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4245-53.
- [9] Thevenot T, Borot S, Remy-Martin A, Sapin R, Cervoni JP, Richou C, et al. Assessment of adrenal function in cirrhotic patients using concentration of serum-free and salivary cortisol. *Liver Int* 2011;31:425-33.

- [10] Cooper MS, Stewart PM. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N Engl J Med* 2003;348:727-34.
- [11] Coolens JL, Van Baelen H, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem* 1987;26:197-202.
- [12] Dorin RI, Pai HK, Ho JT, Lewis JG, Torpy DJ, Urban FK, 3rd, et al. Validation of a simple method of estimating plasma free cortisol: role of cortisol binding to albumin. *Clin Biochem* 2009;42:64-71.
- [13] Hamrahian AH, Oseni TS, Arafah BM. Measurements of serum free cortisol in critically ill patients. *N Engl J Med* 2004;350:1629-38.
- [14] Arafah BM. Hypothalamic pituitary adrenal function during critical illness: limitations of current assessment methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3725-45.
- [15] Marik PE, Gayowski T, Starzl TE. The hepatoadrenal syndrome: a common yet unrecognized clinical condition. *Crit Care Med* 2005;33:1254-9.
- [16] Ren JC, Banan A, Keshavarzian A, Zhu Q, Lapaglia N, McNulty J, et al. Exposure to ethanol induces oxidative damage in the pituitary gland. *Alcohol* 2005;35:91-101.
- [17] Frances R, Zapater P, Gonzalez-Navajas JM, Munoz C, Cano R, Moreu R, et al. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2008;47:978-85.
- [18] Zapater P, Frances R, Gonzalez-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, et al. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology* 2008;48:1924-31.
- [19] Stewart PM, Burra P, Shackleton CH, Sheppard MC, Elias E. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency and glucocorticoid status in patients with alcoholic and non-alcoholic chronic liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:748-51.



- [20] Valentino R, Tommaselli AP, Savastano S, Stewart PM, Ghiggi MR, Galletti F, et al. Alcohol inhibits 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat kidney and liver. *Horm Res* 1995;43:176-80.
- [21] Ahmed A, Saksena S, Sherlock M, Olliff SP, Elias E, Stewart PM. Induction of hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in patients with alcoholic liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;68:898-903.
- [22] Dhillo WS, Kong WM, Le Roux CW, Alagband-Zadeh J, Jones J, Carter G, et al. Cortisol-binding globulin is important in the interpretation of dynamic tests of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis. *Eur J Endocrinol* 2002;146:231-5.
- [23] Vincent RP, Etogo-Asse FE, Dew T, Bernal W, Alagband-Zadeh J, le Roux CW. Serum total cortisol and free cortisol index give different information regarding the hypothalamus-pituitary-adrenal axis reserve in patients with liver impairment. *Ann Clin Biochem* 2009;46:505-7.
- [24] Ho JT, Al-Musalhi H, Chapman MJ, Quach T, Thomas PD, Bagley CJ, et al. Septic shock and sepsis: a comparison of total and free plasma cortisol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:105-14.
- [25] Wade M, Baid S, Calis K, Raff H, Sinaii N, Nieman L. Technical details influence the diagnostic accuracy of the 1 microg ACTH stimulation test. *Eur J Endocrinol* 2010;162:109-13.
- [26] Beishuizen A, van Lijf JH, Lekkerkerker JF, Vermes I. The low dose (1 microg) ACTH stimulation test for assessment of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neth J Med* 2000;56:91-9.
- [27] Christ-Crain M, Stolz D, Jutla S, Couppis O, Muller C, Bingisser R, et al. Free and total cortisol levels as predictors of severity and outcome in community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:913-20.

## Tables and figures: Legends

### **Table 1:**

Quantitative values are means  $\pm$  standard deviation. MAP means mean arterial pressure. Details on characteristics of patients according to Child-Pugh class are reported in [9].

### **Table 2:**

Quantitative values are means  $\pm$  standard deviation (SD). ¶ P value for comparison between Child-Pugh A and B, and Child-Pugh A and C using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. All cortisol values are expressed in nmol/L (1  $\mu$ g/dL=27.6 nmol/L)

### **Table 3:**

### **Table 4a and 4b:**

Only variables with a P value  $< 0.2$  in univariate analysis were entered in the logistic regression. Meld and Child-Pugh were entered as quantitative variables for adjustment. In the two models CBG was removed by the backward procedure.

### **Figure 1:**

Box plots show  $T_0$  SFC concentrations according to CBG and albumin concentrations in 95 stable cirrhotic patients.

Plots show that comparison of  $T_0$  SFC levels according to albumin levels ( $\leq 25$  g/L vs.  $> 25$  g/L) and CBG levels ( $\leq 35$  mg/L vs.  $> 35$  mg/L) did not vary significantly. Boxes show interquartile ranges, and error bars represent the lowest and highest observed values within 1.5 times the length of the box. Horizontal lines denote median values.

### **Figure 2A et 2B:**

Bland-Altman plots representing error structure of mean of SFC plus estimated cortisol (x-axis) and the percentage difference between measured SFC and SFC solutions estimated using Coolens' solution (Figure 2A) and cubic solution (Figure 2B). The dashed line represents bias (percent). Open diamonds represent baseline values, and open circles represent 30 min post-tetracosactrin (1 µg).

**Figure 3:**

Probability of survival in 90 cirrhotic patients without liver transplantation according to the post-LD-SST SFC concentrations (<79 nmol/L in 31 patients and ≥79 nmol/L in 59 patients). At the study end, 15 (25.4%) and 2 (6.4%) patients with high and low SFC concentrations died, respectively.



**Table 1:** Cohort characteristics.

	All patients (n=95)	Survivors* (n=73)	Deceased (n=17)	P
Mean follow up (months), mean±SD	15.9±6.5 <sup>£</sup>	18.8±2.5	3.6±2.8	0.0001
range	0.26-22.6	12.1-22.6	0.26-10.3	
Age (yr)	58.2±9.7	57.3±9.4	62.5±10.6	0.08
Male gender (%)	68.4	65.7	76.5	0.56
Aetiology of cirrhosis				
Alcoholic (%)	84.2 /	86.3 /	82.3 /	0.39
Active drinker (%)	46.8	38.3	47.6	
MELD score	16.1±7.4	14.0±5.8	22.6±7.9	0.0001
	34A / 29B / 32C	33A/24B/16C	5B / 12C	
Child-Pugh score	8.1±2.4	7.5±2.3	10.1±1.4	0.0001
MAP (mmHg)	85.2±14.9	87.1±14.5	79.6±14.9	0.06
Heart rate (bpm)	72.6±13.9	71.7±13.6	75.0±8.1	0.36
Total bilirubin (µmol/L)	77.0±115.8	58.8±101.9	149.5±149.3	0.0009
INR	1.75±0.82	1.54±0.47	2.26±0.96	0.0008
Albumin (g/L)	29.7±7.7	31.5±7.2	23.5±6.4	0.0004
CBG (mg/L)	36.4±13.2	38.8±13.5	28.9±8.6	0.007
Creatinine (µmol/L)	80.1±28.5	77.0±18.5	89.6±45.4	0.93
Sodium (mmol/L)	137.9±4.2	138.1±4.1	136.3±4.4	0.08
Potassium (mmol/L)	3.9±0.5	3.9±0.5	4.0±0.6	0.53
HDL cholesterol (g/L)	0.32±0.18	0.39±0.19	0.24±0.08	0.0012
Total cholesterol (g/L)	1.31±0.56	1.5±0.5	1.3±0.7	0.06
Protein C reactive (mg/L)	15.3±17.8	12.2±13.6	28.5±26.8	0.003

\*Five patients received liver transplant, therefore were not included in mortality analyses.

£: Mean follow-up and range of the 90 non-transplanted patients.

**Table 2:** Adrenal function assessment with the LD-SST in 95 non-septic cirrhotic patients.

	<b>T<sub>0</sub> basal</b>		<b>T<sub>30</sub> post LD-SST</b>		<b>Increment (T<sub>30</sub> - T<sub>0</sub>) post LD-SST</b>	
	Mean ± SD (range), nmol/L	p- value <sup>¶</sup>	Mean ± SD (range), nmol/L	p- value <sup>¶</sup>	Mean ± SD (range), nmol/L	p- value <sup>¶</sup>
<b>Serum total cortisol</b>						
Child-Pugh A	428±203 (7-854)	-	724±188 (193-1105)	-	296±125 (57-516 )	-
Child-Pugh B	332±134 (26-611)	0.05	588±117 (349-780)	<0.001	257±116 (53-570)	0.17
Child-Pugh C	338±223 (31-942)	0.04	560±257 (105-1426)	<0.001	222±92 (74-518)	0.01
<b>Serum free cortisol</b>						
Child-Pugh A	43±25 (3-134)	-	94±33 (23-196)	-	51±32 (10-111)	-
Child-Pugh B	42±28 (5-114)	0.5	89±37 (33-216)	0.4	47±29 (22-117)	0.31
Child-Pugh C	58±40 (17-202)	0.17	124±73 (49-322)	0.18	67±43 (5-187)	0.59

**Table 3:** High false-positive rates of baseline and stimulated cortisol (post LD-SST and SD-SST) in 95 cirrhotic patients without AI, stratified by CBG or albumin concentrations.

Cortisol thresholds	Albumin		CBG	
	>25 mg/L	≤25 mg/L	>35 mg/L	≤35 mg/L
<b>Baseline LD-SST (T<sub>0</sub>) cortisol, % (n)</b>				
STC <138 nmol/L <sup>*</sup>	6%(4)	11% (3)	2% (1)	12% (6)
STC 138-365 nmol/L <sup>*</sup>	47% (32)	52% (14)	36% (16)	59% (30)
<b>T<sub>30</sub> LD-SST cortisol, % (n)</b>				
STC ≤440 nmol/L <sup>*</sup>	13% (9)	33% (9)	7% (3)	29% (15)
SFC ≤50 nmol/L <sup>#</sup>	9% (6)	4% (1)	9% (4)	6% (3)
<b>T<sub>60</sub> SD-SST cortisol, % (n)</b>				
STC <510 nmol/L <sup>\$</sup>	3%(2)	15% (4)	0% (0)	12% (6)
Increment in STC ≤248 nmol/L <sup>**</sup>	7% (5)	15% (4)	7% (3)	12% (6)
SFC ≤85 nmol/L <sup>#</sup>	9% (6)	7% (2)	5% (2)	12% (6)

\* according to [8]; # according to [13]; \$ according to [9]; \*\* according to [7].

**Table 4a and 4b:** Variables influencing the outcome in two models of multivariable logistic regression using the Meld (Table 4a) and the Child-Pugh score (Table 4b).

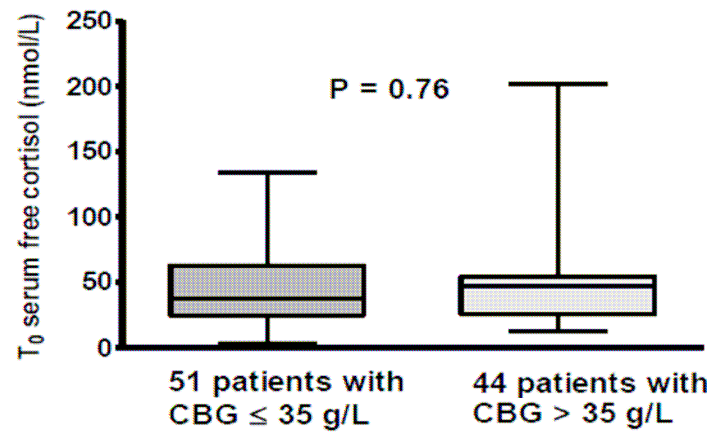
<b>Table 4a: Variables</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>95%CI</b>	<b>P</b>
Meld score	1.21	1.09-1.36	0.0005
Post-SST SFC concentrations $\geq 79$ nmol/L	12.92	1.16-144.14	0.037
Serum albumin concentrations $< 21$ g/L	12.73	2.24-72.57	0.0041

<b>Table 4b: Variables</b>	<b>Odds ratio</b>	<b>95%CI</b>	<b>P</b>
Child-Pugh score	1.76	1.29-2.40	0.0004
Post-SST SFC concentrations $\geq 79$ nmol/L	9.47	1.11-80.84	0.039

Figure 1

T<sub>0</sub> serum free cortisol according to CBG concentrations



T<sub>0</sub> serum free cortisol according to albumin concentrations

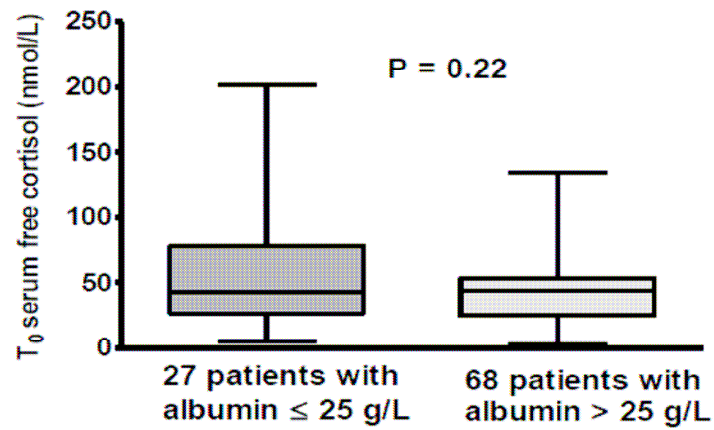
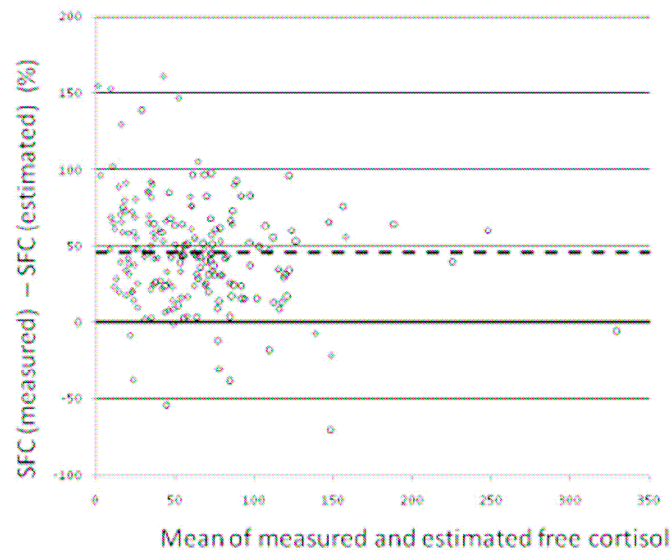


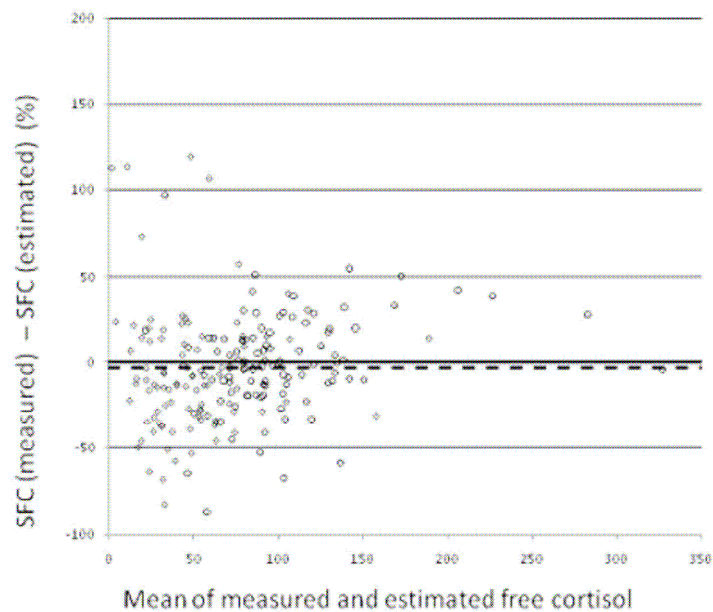
Figure 2A and 2B

2A



Bland-Altman plot of error structure of  
Coolens' estimation vs. measured SFC

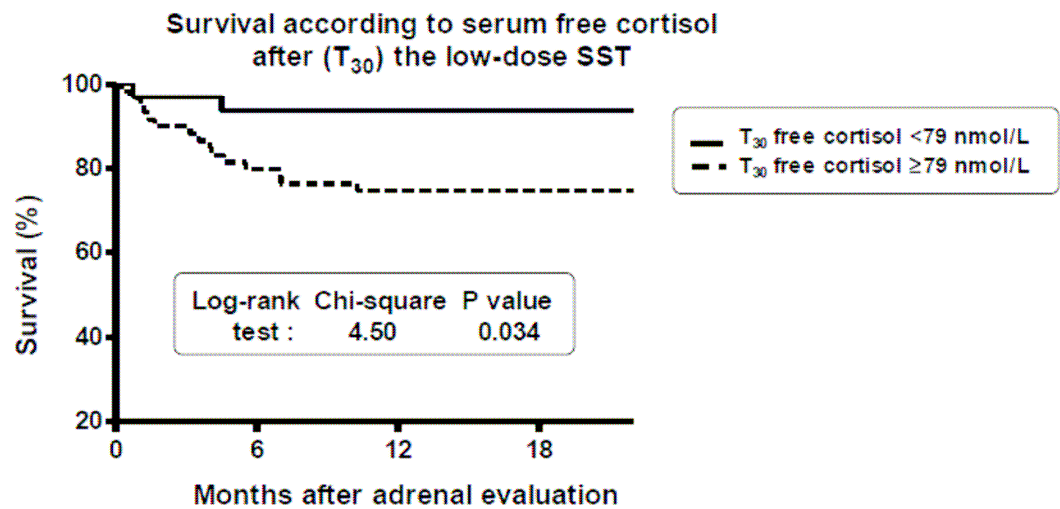
2B



Bland-Altman plot of error structure of  
cubic estimation vs. measured SFC.



Figure 3



## **Position du problème**

Il existe deux tests au Synacthène. Le premier (le plus souvent pratiqué) est dosé à 250 µg. Il procure une stimulation supra-physiologique de la cortico-surrénale et par conséquent ne peut identifier les insuffisances corticotropes modérées, qui peuvent passer inaperçues. Les insuffisances surrénales modérées peuvent en effet répondre au test dosé à 250 µg, à l'inverse du test à 1 µg qui serait donc plus sensible. Toutefois, ce test n'a été étudié que dans une seule publication récente au cours de la cirrhose [115].

Nous avons donc étudié le test à 1 µg chez 95 patients cirrhotiques (cohorte CORTICIR) n'ayant pas d'atteinte surrénale évidente. Le but de cette étude était d'évaluer:

1) les variations des concentrations sériques du cortisol total et du cortisol libre selon les différents stades de gravité de la cirrhose (score de Child-Pugh),

2) la concordance entre d'une part le cortisol libre mesuré (gold standard) et d'autre part le cortisol libre estimé soit par la formule de Coolens [90], soit par l'équation cubique de Dorin et al. [107]. Les explications concernant ces formules sont présentées aux *chapitres 2.1.10.2 et 2.1.10.3*.

3) le taux de faux positifs en utilisant différents seuils rapportés dans la littérature pour définir l'insuffisance surrénale, en considérant notre population de patients indemne de dysfonction surrénale. En effet, nous n'avons aucune raison de soupçonner une telle pathologie chez nos patients cirrhotiques sans trouble hémodynamique au moment de la réalisation du test au Synacthène et durant un suivi de 12 mois. Le taux de faux positifs a été analysé en regardant les résultats des tests à 1 µg et à 250 µg ; les concentrations de cortisol après stimulation sont mesurées 30 minutes ( $T_{30}$ ) après le test à 1 µg et 60 minutes ( $T_{60}$ ) après le test à 250 µg.

4) Enfin, dans notre premier travail, nous avons suspecté un rôle pronostique du cortisol libre ; nous avons donc suivi cette cohorte pour vérifier cette hypothèse de surmortalité à 12 mois chez les patients cirrhotiques ayant des taux élevés de cortisol libre.

## **Elaboration de la recherche**

Les 125 patients cirrhotiques de la cohorte CORTICIR avaient tous eu les deux tests au Synacthène (1µg et 250 µg) espacés de 24 heures. Nous avons étudié chez les 95 patients cirrhotiques stables et sans sepsis (34 Child-Pugh A, 29 B et 32 C) le test à 1 µg réalisé à l'admission du patient. Les critères d'inclusion et d'exclusion étaient identiques à ceux de la première étude. La préparation du dosage à 1 µg nécessitait le mélange d'une ampoule de Synacthène à 250 µg dans 250 mL de sérum physiologique ; 1 mL de ce mélange correspondait à 1 µg de Synacthène qui était injecté directement en IV sans

tubulure. Une infirmière dédiée à ce protocole avait été formée pour la préparation et la réalisation de ce test. Les dosages du cortisol libre sérique étaient réalisés à Strasbourg et les dosages du cortisol total sérique et salivaire étaient centralisés à Besançon.

Pour évaluer le taux de faux positifs avec les concentrations du cortisol total sériques, nous avons utilisé les seuils suivants rapportés dans la littérature : 1) une concentration de cortisol total basal ( $T_0$ ) inférieure à 138 nmol/L et comprise entre 138 et 365 nmol/L [157]; 2) une concentration de cortisol total à  $T_{60} \leq 510$  nmol/L (18.5 µg/dL), (il s'agit du seuil standard utilisé avec le test à 250 µg [90, 142]); 3) un delta cortisol après le test à 250 µg  $\leq 250$  nmol/L, selon le critère du « *critical illness-related corticosteroid insufficiency* (CIRCI) » [187], et 4) une concentration de cortisol total à  $T_{30} \leq 440$  nmol/L (16 µg/dL) après le test à 1 µg, suggérée par une récente méta-analyse [157].

Pour évaluer le taux de faux positifs avec les concentrations du cortisol libre sérique, nous avons utilisé les seuils suivants: 1) concentrations de cortisol libre à  $T_0 < 50$  nmol/L [26], 2) une concentration de cortisol libre à  $T_{60} \leq 85$  nmol/L (test à 250 µg), correspondant à une stimulation supra-physiologique de la surrénale [142], et 3) une concentration de cortisol libre à  $T_{30} \leq 50$  nmol/L, correspondant à une stimulation physiologique sous-maximale [26].

Pour évaluer la survie de ces patients, nous avons fixé la date de point au 17 février 2010, c'est-à-dire 12 mois après la dernière inclusion dans l'étude. Lorsque le statut vital du patient n'était pas connu à la date de point, le médecin traitant du patient était contacté par téléphone.

Les concentrations de cortisol libre mesuré ont été comparées à celles du cortisol libre estimées par l'équation quadratique de Coolens et al. [90] et par l'équation cubique de Dorin et al. [107]. Cette dernière équation est fondée sur la loi d'action de masse, les concentrations mesurées de la CBG et de l'albumine. Pour optimiser cette équation, nous avons utilisé la méthode du maximum de vraisemblance pour déterminer les constantes de dissociation entre le cortisol et la CBG ( $K_C = 95$  nmol/L) d'une part, et le cortisol et l'albumine ( $K_A = 233,7$  nmol/L) d'autre part.

### **Analyse statistique**

L'analyse statistique était similaire à celle de l'article précédent. Pour les comparaisons des variables quantitatives entre chaque groupe, nous avons utilisé le test de Kruskal-Wallis. L'étude de la concordance entre les concentrations mesurées et estimées du cortisol libre était illustrée par la méthode de Bland et Altman. L'étude des corrélations entre les différentes mesures du cortisol était réalisée avec le coefficient de corrélation de Spearman. Nous avons effectué une analyse en régression logistique, univariée puis multivariée, pour identifier les variables capables de prédire le décès sans transplantation

hépatique. Les variables quantitatives étaient dichotomisées après avoir déterminé le meilleur seuil discriminant les patients décédés et survivants par des courbes ROC. Du fait de la colinéarité des variables "Child-Pugh" et "MELD", nous avons réalisé deux modèles séparés de régression logistique pour la prédiction du décès. Les variables prédictives ayant un « p » < 0,2 en analyse univariée étaient retenues pour l'analyse multivariée. Les courbes de survie ont été établies par la méthode de Kaplan-Meier.

## **Résultats**

Nos principaux résultats sont les suivants :

1) Les concentrations du cortisol libre après le test à 1 µg ne variaient pas significativement entre les trois classes du Child-Pugh. En tout cas, nous n'avons pas observé de baisse des concentrations sériques du cortisol libre, contrairement aux concentrations du cortisol total qui baissaient avec la sévérité de la cirrhose et de façon concomitante à la baisse de la CBG et de l'albumine (**Tableau 2** de l'article).

Les concentrations moyennes du cortisol total à T<sub>0</sub> et à T<sub>30</sub> étaient plus basses chez les patients du groupe Child-Pugh C par rapport aux patients Child-Pugh A (chute de 25%). Les concentrations du cortisol total à T<sub>0</sub> étaient plus basses chez les patients a) ayant une albuminémie < 25 g/L par rapport à ceux ayant une albuminémie ≥ 25 g/L (333±192 vs 387±195 nmol/L ; p<0.001) et b) ayant une CBG sérique < 35 g/L par rapport aux patients ayant une CBG ≥ 35 g/L (298±165 vs 450±198 nmol/L ; p<0.001).

Les patients ayant une cirrhose classée Child-Pugh C avaient des concentrations de cortisol libre à T<sub>0</sub> (57.8±40.2 vs 42.4±26.5 nmol/L; P=0.06) et à T<sub>30</sub> (124.4±72.7 vs 91.6±34.6 nmol/L; P=0.07) plus élevées que les patients que les patients Child-Pugh A/B, indépendamment des taux de CBG et d'albumine.

Dans cette étude, un délai de 24h avait été observé entre les tests à 1µg et à 250µg réalisés chez chaque patient, et la question de la pertinence de ce délai pouvait être posée. Nous avons observé que les concentrations du cortisol total (et du cortisol libre) à l'état basal (T<sub>0</sub>) lors des deux tests étaient similaires, ce qui suggérait que l'équilibre des concentrations sériques du cortisol avait pu se rétablir avant la réalisation du second test à 250 µg. De plus, les concentrations du cortisol libre à T<sub>30</sub> (test à 1 µg) étaient bien corrélées à celles réalisées à T<sub>60</sub> (test à 250 µg ; r = 0.75), suggérant une réponse surrénalienne régulière aux différentes stimulations des surrénales, et bien présente lors du test à 1 µg.

Les concentrations à T<sub>0</sub> du cortisol total et du cortisol libre mesuré étaient bien corrélées (r = 0,75 sur l'ensemble des patients; r = 0,82 chez les 27 patients avec une albuminémie < 25 g/L; et r = 0,75 chez les 68 patients avec une albuminémie ≥ 25 g/L). La

corrélation entre les concentrations à  $T_{30}$  (test à 1  $\mu\text{g}$ ) du cortisol total et du cortisol libre étaient plus faible :  $r = 0,54$  sur l'ensemble des patients;  $r = 0,53$  chez les patients avec une albuminémie  $< 25 \text{ g/L}$ ; et  $r = 0,64$  chez les patients avec une albuminémie  $\geq 25 \text{ g/L}$ . Cela suggère une plus faible capacité des protéines porteuses à se lier au cortisol après le test à 1  $\mu\text{g}$ .

2) Dans cette cohorte de patients cirrhotiques, à priori indemnes d'insuffisance surrénale, nous montrons que les tests au Synacthène affichent des taux élevés de faux positifs de « dysfonction surrénale » (cf. **tableau 3** de l'article).

Ce tableau montre que le taux de faux positifs ( $<138 \text{ nmol/L}$  : 5%) avec les concentrations basales du cortisol total chez les patients normo-protidiques (CBG et albumine) est identique à celui observé dans la population générale [157] ; ce taux de faux positifs augmente nettement dès que les concentrations d'albumine ou de CBG baissent.

Lorsqu'on prend le seuil de cortisol libre avant Synacthène proposé par Arafah (c'est-à-dire une concentration de cortisol libre  $\leq 50 \text{ nmol/L}$ ), on constate qu'environ 65% de nos patients avaient des concentrations inférieures à ce seuil, suggérant une dysfonction surrénale largement surestimée. Une concentration post-Synacthène ( $T_{30}$ ) de cortisol libre  $\leq 50 \text{ nmol/L}$  est basée sur la réponse physiologique sous-maximale décrite chez les patients gravement malades [26]. De plus, nous observons qu'une valeur du cortisol libre à  $49 \text{ nmol/L}$  correspond au 5<sup>ème</sup> percentile (spécificité à 95%) de la distribution du cortisol libre à  $T_{30}$ . En prenant une spécificité à 90%, le seuil du cortisol libre serait à  $56 \text{ nmol/L}$ .

Les taux de faux positifs avec les concentrations post-Synacthène ( $T_{30}$ ) du cortisol total chez les patients hypo-protidiques étaient similaires à ceux affichés dans d'autres populations [157]. Les concentrations post-Synacthène ( $T_{30}$ ) de cortisol libre  $\leq 50 \text{ nmol/L}$  ont des taux de faux positifs faibles et similaires à ceux observés avec le test à  $250 \mu\text{g}$  (en prenant un cortisol libre à  $T_{60} < 85 \text{ nmol/L}$ ), que ce soit chez les patients ayant ou pas des concentrations basses de CBG ou d'albumine.

3) En utilisant la méthode de Bland et Altman, nous montrons que l'estimation des concentrations de cortisol libre sérique avant et 30 minutes après Synacthène (test à 1  $\mu\text{g}$ ) par la formule de Coolens est biaisée chez le patient cirrhotique (**Figure 2A** de l'article). En effet, cette équation sous-estime les concentrations du cortisol libre sérique avec un biais moyen de  $45\% \pm 35$  ( $P < 0.001$ ). Le pourcentage d'erreur de la formule de Coolens était corrélé négativement avec l'albuminémie ( $r = -0.15$ ,  $P = 0.04$ ), indiquant que cette formule est inadaptée surtout chez les patients ayant une hypoalbuminémie.

A l'inverse, l'équation cubique élaborée par l'équipe de Richard Dorin pour estimer le cortisol libre sérique ne présentait pas de biais significatif ( $-4\% \pm 33$  ;  $P = 0.14$ ) (**Figure 2B** de

l'article). Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre le pourcentage d'erreur de la formule de Dorin et l'albuminémie. Nous pouvons donc affirmer que cette formule est plus précise pour estimer le cortisol libre que l'équation de Coolens.

Nous avons complété ces résultats obtenus avec le test à 1 µg en comparant les concentrations du cortisol libre sérique estimées par la formule de Coolens et par celle de Dorin, avec les concentrations mesurées du cortisol libre en utilisant les valeurs du cortisol avant et après le test au Synacthène à 250 µg ; ces résultats sont superposables à ceux obtenus avec le test à 1 µg et ont été présentés aux Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive 2011.

4) Enfin, notre dernier et principal résultat est l'observation qu'une concentration élevée de cortisol libre sérique après stimulation par le test au Synacthène à 1µg est directement associée au risque de décès chez les patients cirrhotiques indemnes de dysfonction surrénale. Ces patients (n=90) ont été suivi pendant  $15.9 \pm 6.5$  mois et 17 (19%) d'entre eux sont décédés  $3.6 \pm 2.8$  mois après l'évaluation de leur surrénale.

Comparativement aux 73 survivants, les 17 patients décédés avaient un score de Child-Pugh ( $10,1 \pm 1,4$  vs.  $7,5 \pm 2,3$ ;  $P < 0,001$ ) et de MELD plus élevés ( $22,6 \pm 7,9$  vs.  $14 \pm 5,8$ ;  $P < 0,001$ ), un INR plus élevé ( $2,26 \pm 0,96$  vs.  $1,54 \pm 0,47$ ;  $P < 0,001$ ), une bilirubinémie plus élevée ( $149,5 \pm 149,3$  vs.  $58,8 \pm 101,9$  µmol/L;  $P < 0,001$ ), une albuminémie plus basse ( $23,5 \pm 6,4$  vs.  $31,5 \pm 7,2$  g/L;  $P < 0,001$ ), un HDL-cholesterol plus bas ( $0,24 \pm 0,08$  vs.  $0,39 \pm 0,19$  g/L;  $P = 0,0012$ ), tandis que l'âge, la créatininémie, le cholestérol total n'étaient pas significativement différents. Les concentrations du cortisol libre à  $T_{30}$  étaient plus élevées ( $129 \pm 67$  vs.  $94 \pm 41$  nmol/L;  $P = 0,02$ ) et celles de la CBG plus basses ( $29 \pm 9$  vs.  $39 \pm 14$  mg/L;  $P = 0,007$ ) chez les patients décédés.

Pour prédire la mortalité, l'aire sous la courbe (AUC) du cortisol libre à  $T_{30}$  (test à 1 µg) était à 0,69 (IC 95% : 0,56-0,83), comparée à l'AUC du cortisol libre à  $T_{60}$  (test à 250 µg) à 0.61 (IC 95% : 0,44-0,77). La capacité discriminante du cortisol libre à  $T_{60}$  était similaire à celle du cortisol libre à  $T_0$  [AUC à 0.61 (0.45-0.77)] pour le test à 250 µg.

Une concentration du cortisol libre à  $T_{30} < 79$  nmol/L était associée à une faible probabilité de décès à 1 an (rapport de vraisemblance à 0,14), alors que les patients avec un cortisol libre à  $T_{30} > 178$  nmol/L avaient deux fois plus de risque de décéder. Le meilleur seuil de cortisol libre post Synacthène (test à 1 µg) discriminant les patients décédés et les patients survivants à 1 an était de 79 nmol/L ; cette valeur était obtenue en regardant l'index de Youden ( $Y = \text{sensibilité} + \text{spécificité} - 1$ ). Dans nos deux modèles de régression logistique multivariée (**Tableaux 4a et 4b** de l'article) : une concentration du cortisol libre à  $T_{30} > 79$  nmol/L était prédictive du décès à 1 an, indépendamment de l'albuminémie et des scores de Child-Pugh ou de MELD. Les courbes de survie (**Figure 3** de l'article) des patients ayant un



cortisol libre sérique post-Synacthène  $\geq 79$  nmol/L (n=59) ou  $< 79$  nmol/L (n=31) illustre bien ce résultat tout à fait innovant, à savoir que ce sont les patients ayant les plus fortes concentrations du cortisol libre qui ont la moins bonne survie.

## **Conclusion**

Nous confirmons avec le test à 1  $\mu$ g que le cortisol total sérique est inadapté pour évaluer la fonction surrénale chez le patient cirrhotique, surtout lorsque les concentrations des protéines porteuses du cortisol baissent.

Par rapport à **l'article 6** présenté dans cette thèse, cet article apporte deux informations essentielles : 1) L'estimation du cortisol libre sérique par des équations mathématiques doit prendre en compte les valeurs mesurées de l'albuminémie. Nous avons validé dans notre cohorte de patients cirrhotiques la formule de Dorin pour la mesure indirecte du cortisol libre. Nous montrons aussi que la formule plus ancienne de Coolens n'est pas adaptée dans cette population. 2) Les concentrations de cortisol libre, contrairement au cortisol total sérique, ne baissent pas avec la dégradation de la fonction hépatique, mais ont plutôt tendance à augmenter au stade C du Child-Pugh. De façon intéressante, nous observons même que ce sont les patients ayant les plus fortes concentrations de cortisol libre sérique qui sont les plus à risque de décès. Nos résultats n'adhèrent donc pas à l'idée répandue de l'existence d'un « syndrome hépato-surrénalien ».

# Chapitre 4 : DISCUSSION

## GENERALE ET PERSPECTIVES

### 4.1) L'ascite : paracentèse, diagnostic d'ISLA et inflammation systémique

L'analyse de nos résultats aura permis, nous l'espérons, d'apporter une pierre supplémentaire aux connaissances acquises sur les risques de la ponction d'ascite, sur les méthodes valides pour le diagnostic d'ISLA, et sur les intrications entre d'une part l'inflammation systémique mesurée par la CRP et le cortisol sérique ou salivaire, et d'autre part le pronostic des patients cirrhotiques.

La communauté des médecins hépato-gastroentérologues redoutent l'ISLA car elle reste asymptomatique, du moins initialement, dans au moins 10% des cas environ. La paracentèse est l'acte diagnostique a réalisée sans délai devant toute ascite n'ayant pas encore été explorée. Ce geste, souvent réalisé par des étudiants en médecine, est considéré comme sûr. Cependant, la paracentèse n'est pas dénuée de complications, heureusement le plus souvent mineures. Le profil type du patient à risque de complication a été bien identifié par notre étude (cf. **article 1** de cette thèse page 81). Nous manquons toutefois de données prospectives concernant les complications de la paracentèse chez les patients ayant des plaquettes  $< 50000/\text{mm}^3$  et/ou un INR  $> 3,5$  ; de telles valeurs n'étaient en effet retrouvées que dans 11% et 12% des patients de notre étude, respectivement. Il serait intéressant d'établir un observatoire national rapportant tous les évènements post-paracentèse survenant chez ces patients. De même, il pourrait être intéressant d'évaluer l'impact du matériel utilisé sur la survenue des complications.

Au-delà du risque iatrogène, les patients cirrhotiques les plus sévères avec ascite sont à haut risque d'infections spontanées et d'aggravation de l'hypertension portale. L'infection bactérienne est un événement non anodin dans l'histoire naturelle de la cirrhose et la reconnaissance de son pronostic défavorable sur la survie à 1 an (mortalité de 63%) a été confirmée par une analyse récemment publiée compilant 178 études ayant inclus près de 12000 patients [30]. La translocation bactérienne de bactéries à Gram-négatif est responsable de la présence de lipopolysaccharide dans le sang (le LPS est un élément de la paroi externe de ces bactéries) et il a été montré que les concentrations sériques de LPS

augmentent avec la gravité de la cirrhose évaluée par le score de Child-Pugh [175], conduisant à une production excessive de cytokines pro-inflammatoires [65, 320]. Cette réponse inflammatoire induit une hyperproduction d'une substance vasorelaxante, le monoxyde d'azote, qui est impliquée de façon majeure dans le mécanisme des anomalies circulatoires associées à la cirrhose [121, 325]. Nous pensons que la translocation bactérienne, et son corollaire l'inflammation systémique, jouent un rôle majeur dans la survenue des complications de la cirrhose. Comme témoin de l'implication de la translocation bactérienne sur une pression artérielle basse et une aggravation de la dysfonction endothéliale intra-hépatique, l'équipe de Barcelone a montré qu'on pouvait détecter de l'ADN bactérien dans le sérum chez 38% des patients cirrhotiques avec ascite victimes de ces anomalies [41]. La présence de ces fragments d'ADN bactérien dans le sérum et/ou l'ascite, en l'absence d'infection patente, n'est pas seulement un marqueur de translocation bactérienne. Il s'agit aussi d'un marqueur pronostique certain reflétant l'équilibre immunitaire précaire du patient cirrhotique [333]. Une étude multicentrique française (étude NORFLOCIR) coordonnée par le Dr Moreau et à laquelle nous participons évalue l'intérêt d'une décontamination bactérienne intestinale sélective par l'administration prolongée de norfloxacine avec l'espoir d'améliorer le pronostic des malades atteints de cirrhose avancée. La manipulation du microbiote intestinal par des pré- ou pro-biotiques est un axe de recherche d'actualité dans les atteintes hépatiques liées à l'alcool [331] et la cirrhose. L'étude NORFLOCIR a pour ambition légitime de bloquer (ou de limiter au maximum) la translocation bactérienne intestinale et par conséquent, de prévenir les manifestations inflammatoires qui en découlent, avec peut-être plus de sécurité pour les malades que ne le ferait une corticothérapie générale à visée anti-inflammatoire. L'étude NORFLOCIR possède toutefois l'inconvénient théorique de sélectionner des souches bactériennes résistantes aux quinolones qui pourraient, au final, être responsables d'infections sévères risquant de nuire au résultat global de l'étude. Forte de ses connaissances nouvelles sur l'inflammation systémique et ses conséquences sur l'hypertension portale et le pronostic vital, notre équipe a eu l'idée de s'intéresser à la CRP. Ce marqueur biologique, facile à quantifier, est fortement corrélé au SRIS dans l'étude bisontine (**article 4** de cette thèse). Il s'agit d'un avantage certain car les critères clinico-biologiques du SRIS sont souvent modifiés par la cirrhose elle-même rendant l'interprétation du SRIS difficile. Le lien entre la SRIS et la CRP avait déjà été suggéré par le travail de Rosenbloom et al. montrant que la présence d'un SRIS était associée au cours de la cirrhose à une activation de la réponse pro-inflammatoire sous l'effet d'une sécrétion d'IL-6 [242]; or nous savons que la CRP est synthétisée à la phase aiguë de l'inflammation principalement en réponse à l'IL-6. Notre principal résultat réside dans la démonstration que la CRP permet facilement de distinguer le sous-groupe de patients cirrhotiques à haut risque de mourir dans les 6 mois. Ces résultats ouvrent la voie à

d'autres perspectives : identifier plus finement les patients cirrhotiques candidats à une greffe de foie fait partie de nos préoccupations actuelles. Nous souhaiterions valider prospectivement l'intérêt pronostique de la CRP et étudier la relation entre CRP et SRIS dans l'optique de construire un nouveau score pronostique « MELD-CRP » chez le patient cirrhotique grave (un score de Child-Pugh supérieur à 8 définit classiquement la cirrhose grave). Une autre perspective concrète de notre travail serait en quelque sorte d'affiner l'étude NORFLOCIR en testant la pertinence d'un traitement antibiotique de décontamination bactérienne chez les patients sélectionnés non seulement sur la gravité de leur cirrhose mais aussi sur des marqueurs de translocation bactérienne (comme la détection d'ADN bactérien dans le sérum et/ou l'ascite) ou des marqueurs d'inflammation systémique prolongée, comme une CRP élevée pendant plus de 15 jours. Une autre voie de recherche dans ce domaine pourrait concerner des polymorphismes touchant des gènes impliqués dans l'immunité innée, comme NOD2, TLR4, et TLR2. Les mutations du gène NOD2 (nucleotide-binding oligomerisation domain) pourraient ainsi jouer un rôle important dans le pronostic de la cirrhose. Les protéines NODs et TLR 1, 2, 4 et 6 sont exprimées au niveau des macrophages, des monocytes et des polynucléaires neutrophiles et jouent un rôle dans la reconnaissance de composés microbiens comme le muramyl dipeptide (composant du peptidoglycane bactérien), le LPS et les lipoprotéines. Une étude récente ayant inclus 150 patients cirrhotiques ascitiques a montré qu'il existait un lien entre les variants NOD2 et le risque d'ISLA d'une part et le risque de décès d'autre part [24]. Dans cette étude, les variants de NOD2 étaient plus souvent présents chez les patients ayant un SRIS, mais le faible nombre de patients atteints de SRIS empêchait toute analyse statistique. Les mutations TLR4 et TLR2 font aussi l'objet d'études prometteuses. Le signal transmis par TLR4 induit l'activation du TNF $\alpha$  et la réponse inflammatoire médiées par le LPS. L'équipe de Barcelone a observé une relation entre la présence du polymorphisme TLR4 D299G et l'incidence des infections bactériennes chez des patients cirrhotiques avec ascite [137]. En reprenant leur cohorte de patients cirrhotiques avec ascite, l'équipe dirigée par Appenrodt a récemment observé que certains polymorphismes du gène TLR2 étaient aussi un facteur de risque d'ISLA [215]; ce résultat va dans le sens de nos connaissances actuelles sur l'écologie des infections du patient cirrhotique puisque les bactéries à Gram-positif (ligands habituels des TLR2) sont devenues une importante source d'infection dans cette population [118]. Par ailleurs, certaines protéines, les « Mannose-binding lectin » (MBL), jouent un rôle important dans la défense immunitaire innée en amplifiant la fixation du complément à la surface des pathogènes qui contiennent du mannose. La synthèse des MBL est d'origine hépatique, en réponse aux cytokines proinflammatoires, et pourrait être altérée au cours des cirrhoses sévères. Une récente étude a montré l'importance de ces protéines dans la défense immunitaire du patient cirrhotique : après ajustement sur le score de Child-Pugh, les

co-morbidités, le sexe et l'âge, l'analyse multivariée montrait qu'un déficit en MBL était un facteur de risque indépendant d'infection bactérienne [14].

Nous pensons donc que ces nouveaux marqueurs de l'immunité innée permettraient d'identifier parmi les patients cirrhotiques avec une ascite pauvre en protides, ceux ayant le plus haut risque de développer une infection, et par conséquent candidats à une prophylaxie primaire de l'ISLA. Cette étude est en cours de conception, avec la collaboration des bactériologistes et des immunologistes de Besançon (Dr Couetdic et Pr Saas).

## 4.2) Cirrhose et insuffisance surrénale

La connaissance des mécanismes impliqués dans la genèse ou l'aggravation de l'hypertension portale permettent d'entrevoir de nouvelles pistes thérapeutiques et de nouveaux axes de recherche [55, 272, 287]. Ces 10 dernières années, plusieurs publications faisaient état d'une prévalence élevée de dysfonction surrénale au cours de la cirrhose, en situation hémodynamiquement stable ou en sepsis. Des mécanismes physiopathologiques supposés avaient rendu plausible le lien entre la dysfonction surrénale et la cirrhose (cf. **figure I** au *chapitre 1.2* et cf. *chapitre 2.2.2.1*).

Compte tenu de la rareté de l'insuffisance surrénale dans la population générale (environ 60 cas/millions d'habitants), les fortes prévalences rapportées dans la population patients cirrhotiques (30% chez le cirrhotique non infecté et jusqu'à 70% en cas de choc septique) suggérait soit l'existence d'un lien physiopathologique réel entre la cirrhose et la dysfonction surrénale, soit une surestimation de la prévalence de la dysfonction surrénale du fait de l'utilisation d'un estimateur (en l'occurrence le cortisol total sérique) non adapté aux patients cirrhotiques. Nous avons vu au cours de cette thèse que la seconde hypothèse était plus proche de la réalité ; les chiffres de prévalence de l'insuffisance surrénale rapportés au cours de la cirrhose sont bien surestimés par l'utilisation du cortisol total. Ce résultat remet en question l'existence même d'un syndrome hépato-surrénalien tel que prôné par Marik et al. et repris par d'autres auteurs [186].

Nos travaux ont résolument changé notre vision sur la fonction surrénale au cours de la cirrhose. En mesurant la concentration sérique de l'hormone biologiquement active (c'est-à-dire le cortisol *libre*), nous avons montré que non seulement la concentration de cortisol libre ne chutait pas avec la dégradation de la fonction hépatique, mais augmentait de façon significative, reflétant probablement une activation surrénale justifiée par la situation clinique. Dans notre étude, la suspicion de dysfonction surrénale ne résultait que d'une baisse des protéines porteuses du cortisol en rapport avec l'insuffisance hépatique, qui n'apparaissait qu'à travers le dosage du cortisol total sérique. De plus, aucun patient de notre cohorte n'avait manifesté de symptômes suggestifs d'insuffisance surrénale après un an de suivi.

Bien que cela plaide en faveur de l'absence d'insuffisance surrénale avérée chez le cirrhotique, on ne peut totalement écarter le fait que ces mêmes patients en situation de stress intense pourraient être victimes d'un déficit *relatif* en cortisol. En effet, ce qui compte probablement le plus est la concentration *tissulaire* en corticoïdes. Ce concept a été à l'origine d'une nouvelle terminologie apparue en 2008 : le « CIRCI » (critical illness-related corticosteroid insufficiency) suppose un état de déficit en corticoïdes au niveau cellulaire, soit par un défaut de production, soit par une résistance tissulaire aux corticoïdes [187]. L'exploration de ce concept au cours de la cirrhose reste à faire et s'annonce très difficile, ne serait-ce que par l'absence d'outil de mesure du cortisol cellulaire. De plus, l'intensité du stress semble être un élément insuffisant pour prédire la survenue d'un CIRCI et justifier un recours thérapeutique aux corticoïdes. C'est ce que semblent indiquer les résultats de l'étude CORTICUS où la preuve du bénéfice des corticoïdes sur la survie n'a pu être montrée au cours du choc septique, situation apparentée à un stress maximal [275].

Les inconvénients de l'interprétation du cortisol total au cours de la cirrhose nous invitent à nous rappeler que cortisol n'est qu'un critère de substitution, utilisé à la place d'un critère clinique. Pour ne pas dépendre du critère de substitution, la vraie démonstration de l'existence d'une insuffisance surrénale chez les patients cirrhotiques demanderait la mise en œuvre d'un essai thérapeutique (avec administration d'hydrocortisone) en prenant comme seul critère de jugement un critère clinique, supposé indiscutable. Malheureusement, un tel critère n'existe pas. Dans l'état actuel de nos connaissances, notre recommandation est de continuer à réaliser le test au Synacthène à 250 µg (faute de mieux) devant une suspicion clinique de dysfonction surrénale et de compléter ce test, si possible, par une mesure du cortisol salivaire lorsque le test dynamique standard suggère un défaut de production du cortisol. L'idéal serait de réaliser le dosage du cortisol libre sérique. Nul doute que les avancées technologiques parviendront à rendre ce dosage réalisable en routine, comme cela a déjà été le cas dans le passé pour les dosages de la thyroxine libre ou de la testostérone. Il restera à résoudre le problème du coût : pour l'instant le dosage du cortisol libre est facturé à 37,8 euros versus 1,7 euros pour le dosage du cortisol total sérique

Nos travaux sur le sujet ont pour principal mérite celui d'affirmer l'intérêt de la mesure du cortisol libre et lui seul en cas de cirrhose. Leur suite logique serait de mieux connaître la corrélation entre les variations des concentrations de cortisol libre sérique et les différentes complications de la cirrhose, en se référant par exemple aux classifications pronostiques de la cirrhose [30, 95]. Cela permettrait peut-être d'identifier finement les événements les plus délétères pour le pronostic, de pouvoir comparer entre-elles les classifications pronostiques les plus utilisées, et pourrait constituer un critère de jugement nouveau pour de futurs essais thérapeutiques dédiés à cette population. A défaut de dosage reproductible de cortisol libre



disponible, ces travaux pourraient, à la rigueur, utiliser la formule de Richard Dorin comme marqueur indirect. Il faudrait toutefois, au préalable, confirmer l'excellente concordance entre la concentration mesurée de cortisol libre et celle estimée par la formule de Dorin chez des patients cirrhotiques atteints de sepsis sévère ou de choc septique car dans notre cohorte, seuls des cas de sepsis non sévère avaient été testés. Nous pourrions aussi évaluer un autre indicateur de la fonction surrénale, la déhydroépiandrostérone (DHEA). Il s'agit d'un androgène, ACTH-dépendant, sécrété par la zone réticulée de la cortico-surrénale. Le sulfate de DHEA a été testé pour juger de l'intégrité de l'axe HHS chez des patients ayant un adénome hypophysaire et donc à risque d'insuffisance surrénale. Le S-DHEA permettait de corriger les erreurs diagnostiques faites avec le test au Synacthène **[208]**.

La signification pronostique d'une élévation marquée du cortisol libre sérique mesuré au cours de la cirrhose est probablement à mettre en rapport avec l'existence de stress délétères pour les patients, au premier rang desquels les infections bactériennes. Il existe probablement un lien entre l'augmentation du cortisol libre et celle de la CRP, mais les populations de l'article 4 et de l'article 7 n'étaient pas les mêmes et ce lien n'a pas encore été entièrement exploré. A ce jour, nous ne connaissons pas lequel de ces deux marqueurs est plus pertinent pour le pronostic.

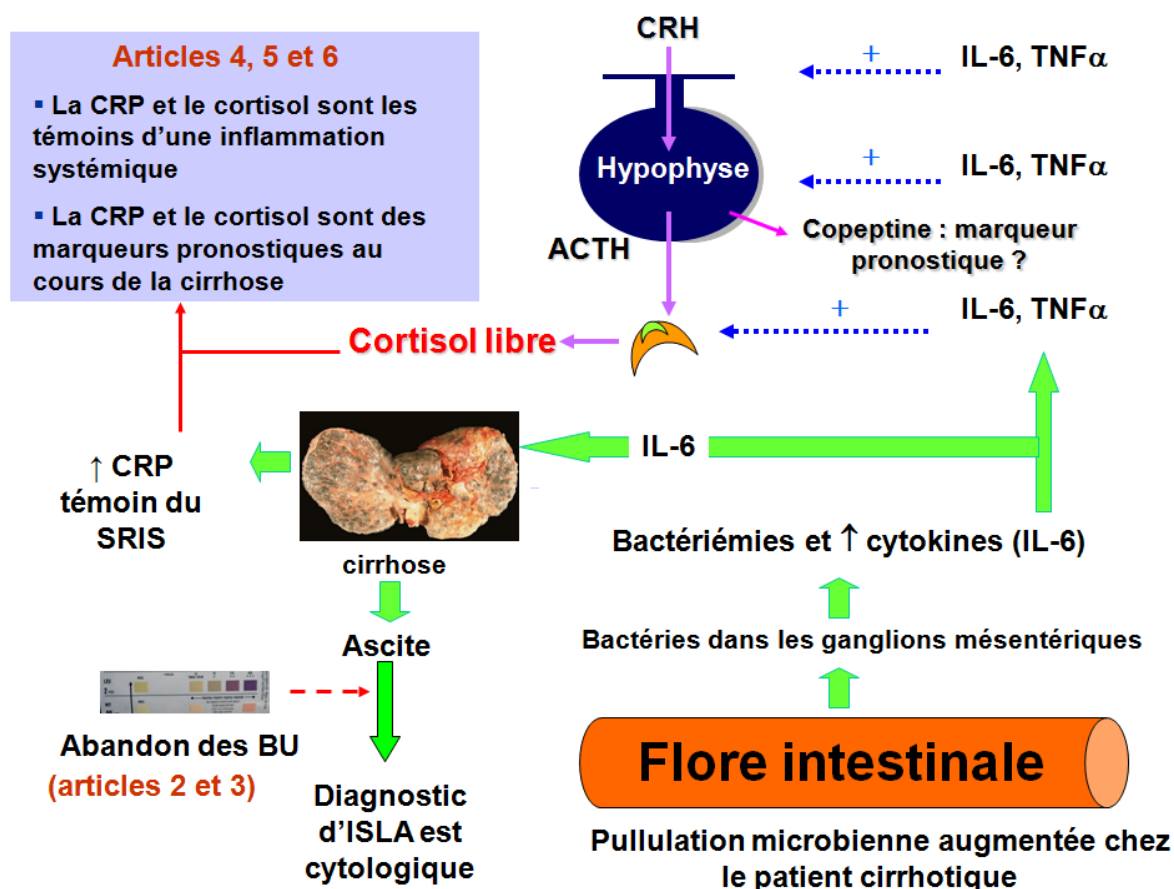
L'inconvénient de la mesure du cortisol est qu'il dépend étroitement de l'intégrité de l'axe HHS. L'idéal serait donc d'évaluer le stress au niveau cérébral en mesurant la CRH (corticotropin-releasing hormone) ou l'AVP (arginine vasopressine) mais ces deux hormones sont difficilement dosables et, comme le cortisol, ont des demi-vies brèves (quelques minutes) **[113, 277]**. La copeptine est le fragment C terminal de la pré-proAVP. Elle est libérée dans le sérum de façon équimolaire à l'AVP. Ainsi, les concentrations de copeptine reflètent étroitement la production d'AVP, que ce soit chez des sujets sains ou en situation de stress comme le sepsis **[204, 277]**. Le principal intérêt de la copeptine est sa stabilité dans le sérum, la facilité de son dosage et une augmentation plus marquée de ses concentrations sériques en rapport avec le niveau de stress comparativement aux concentrations de cortisol **[156]**. Nous avons constitué une demande de financement dans le but d'évaluer la copeptine au cours de la cirrhose **[155]**.

Nos connaissances acquises sur la relation entre la fonction surrénale et la cirrhose nous a permis de développer un autre axe de recherche. L'obtention d'un financement (étude CORT-HEPAT, PHRC interrégional 2011) va nous permettre d'évaluer la fonction surrénale des patients en insuffisance hépatique aiguë car l'équipe du Kings College Hospital a observé 62% de dysfonction surrénale **[143]** après exploration par un test au Synacthène (250 µg) et selon des critères habituellement admis (cortisolémie basale < 250 nmol/L ou pic de cortisolémie < 500 nmol/L ou delta cortisol < 250 nmol/L). Il s'agit d'une

étude multicentrique qui intéressera les hôpitaux de Beaujon, des Hospices civils de Lyon et de Paul-Brousse. Nous regarderons de près les concentrations sériques du cortisol libre par rapport à des groupes contrôles (hépatite aiguë non sévère, volontaires sains et patients ayant une insuffisance surrénale bien documentée).

Un autre point intéressant à développer serait de standardiser la méthode de recueil et la technique de dosage du cortisol salivaire pour établir des références robustes des concentrations normales de cette hormone dans la salive. Une des limites de notre étude était l'absence de groupe contrôle, à savoir des sujets sains et des sujets ayant une insuffisance surrénale bien identifiée, pour discriminer les sujets « pathologiques » des sujets « sains ». Ce défaut sera bientôt rétabli par la future étude CORT-HEPAT qui va inclure ces sujets.

La figure XV ci-dessous illustre le contexte de l'ensemble des travaux commentés dans cette thèse.



**Figure XV** : Représentation schématique des travaux de cette thèse. Il existe chez le patient cirrhotique une augmentation de la pullulation microbienne de la flore intestinale liée principalement à un ralentissement du transit intestinal [51, 77]. Cette pullulation accroît le risque de translocation bactérienne intestinale qui est un facteur associé au risque d'ISLA [127, 251] et de récurrence de l'ISLA [75]. Le dépistage de l'ISLA par les bandelettes urinaires (BU) est actuellement abandonné. Le stress oxydatif lié à l'endotoxémie, aux cytokines pro-inflammatoires et à la synthèse excessive de NO conduit à l'altération de la structure et de la perméabilité intestinale [326]. La conjonction d'une altération marquée des défenses immunitaires, de l'hypomotilité intestinale et de l'altération de la barrière muqueuse intestinale facilite la translocation bactérienne qui va déclencher une réponse immunitaire avec production de cytokines pro-inflammatoires. L'IL-6 stimule la synthèse hépatique de la CRP, témoin biologique de l'inflammation systémique et probablement de la présence d'un SRIS, lui-même considéré comme un facteur pronostique important dans l'évolution de la cirrhose [74]. Les altérations hémodynamiques en rapport avec l'excès de production de NO dans la circulation sanguine conduisent à un défaut d'oxygénation des tissus et au risque de défaillance multiviscérale. Au cours de l'inflammation systémique, il existe une stimulation de l'axe HHS, liée en partie à l'action directe des cytokines pro-inflammatoires sur cet axe ; chez le patient cirrhotique, la fraction libre du cortisol sérique augmente davantage que le cortisol total (comprenant la forme liée à l'albumine et à la CBG) du fait d'une baisse des protéines porteuses du cortisol. Le cortisol libre sérique et la CRP sont des témoins du stress inflammatoire et sont des marqueurs pronostiques chez le patient cirrhotique. La copeptine est produite également en réponse aux cytokines (IL-6 surtout) et pourrait être un nouveau marqueur pronostique au cours de la cirrhose.

## Chapitre 5: BIBLIOGRAPHIE

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-874.
2. EASL clinical practice guidelines on the management of ascites, spontaneous bacterial peritonitis, and hepatorenal syndrome in cirrhosis. *J Hepatol* 2010;53:397-417.
3. Effect of high-dose glucocorticoid therapy on mortality in patients with clinical signs of systemic sepsis. The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. *N Engl J Med* 1987;317:659-665.
4. Abdu TA, Elhadd TA, Neary R, Clayton RN. Comparison of the low dose short synacthen test (1 microg), the conventional dose short synacthen test (250 microg), and the insulin tolerance test for assessment of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in patients with pituitary disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:838-843.
5. Abel SM, Back DJ. Cortisol metabolism in vitro--III. Inhibition of microsomal 6 beta-hydroxylase and cytosolic 4-ene-reductase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;46:827-832.
6. Absalom A, Pledger D, Kong A. Adrenocortical function in critically ill patients 24 h after a single dose of etomidate. *Anaesthesia* 1999;54:861-867.
7. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996;271:518-520.
8. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002;186:1522-1525.
9. Ahmed A, Saksena S, Sherlock M, Olliff SP, Elias E, Stewart PM. Induction of hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in patients with alcoholic liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;68:898-903.
10. Alberts P, Nilsson C, Selen G, Engblom LO, Edling NH, Norling S, Klingstrom G, *et al.* Selective inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves hepatic insulin sensitivity in hyperglycemic mice strains. *Endocrinology* 2003;144:4755-4762.
11. Albillos A, de la Hera A, Gonzalez M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, Ruiz-del-Arbol L, *et al.* Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003;37:208-217.
12. Albillos A, Zamora J. Beta-blockers in patients with cirrhosis and refractory ascites. *Hepatology* 2011.

13. Alolio B, Dorr H, Stuttmann R, Knorr D, Engelhardt D, Winkelmann W. Effect of a single bolus of etomidate upon eight major corticosteroid hormones and plasma ACTH. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1985;22:281-286.
14. Altorjay I, Vitalis Z, Tornai I, Palatka K, Kacska S, Farkas G, Udvardy M, *et al.* Mannose-binding lectin deficiency confers risk for bacterial infections in a large Hungarian cohort of patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 2010;53:484-491.
15. Angeli P. beta-Blockers and refractory ascites in cirrhosis: The message of a team of true scientists. *J Hepatol* 2011.
16. Annane D. ICU physicians should abandon the use of etomidate! *Intensive Care Med* 2005;31:325-326.
17. Annane D, Bellissant E. Prognostic value of cortisol response in septic shock. *Jama* 2000;284:308-309.
18. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Confalonieri M, De Gaudio R, Keh D, *et al.* Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *Jama* 2009;301:2362-2375.
19. Annane D, Bellissant E, Sebille V, Lesieur O, Mathieu B, Raphael JC, Gajdos P. Impaired pressor sensitivity to noradrenaline in septic shock patients with and without impaired adrenal function reserve. *Br J Clin Pharmacol* 1998;46:589-597.
20. Annane D, Maxime V, Ibrahim F, Alvarez JC, Abe E, Boudou P. Diagnosis of adrenal insufficiency in severe sepsis and septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1319-1326.
21. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, *et al.* Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *Jama* 2002;288:862-871.
22. Annane D, Sebille V, Troche G, Raphael JC, Gajdos P, Bellissant E. A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. *Jama* 2000;283:1038-1045.
23. Annetta M, Maviglia R, Proietti R, Antonelli M. Use of corticosteroids in critically ill septic patients : a review of mechanisms of adrenal insufficiency in sepsis and treatment. *Curr Drug Targets* 2009;10:887-894.
24. Appenrodt B, Grunhage F, Gentemann MG, Thyssen L, Sauerbruch T, Lammert F. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2) variants are genetic risk factors for death and spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *Hepatology* 2010;51:1327-1333.
25. Arabi YM, Aljumah A, Dabbagh O, Tamim HM, Rishu AH, Al-Abdulkareem A, Knawy BA, *et al.* Low-dose hydrocortisone in patients with cirrhosis and septic shock: a randomized controlled trial. *Cmaj* 2010;182:1971-1977.
26. Arafah BM. Hypothalamic pituitary adrenal function during critical illness: limitations of current assessment methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3725-3745.

27. Arafah BM, Nishiyama FJ, Tlaygeh H, Hejal R. Measurement of salivary cortisol concentration in the assessment of adrenal function in critically ill subjects: a surrogate marker of the circulating free cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2965-2971.
28. Arlet JB. [Adrenal insufficiency]. *Rev Prat* 2009;59:1443-1449.
29. Arnold C, Haag K, Blum HE, Rossle M. Acute hemoperitoneum after large-volume paracentesis. *Gastroenterology* 1997;113:978-982.
30. Arvaniti V, D'Amico G, Fede G, Manousou P, Tsochatzis E, Pleguezuelo M, Burroughs AK. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010;139:1246-1256, 1256 e1241-1245.
31. Atkinson KR, Lo KR, Payne SR, Mitchell JS, Ingram JR. Rapid saliva processing techniques for near real-time analysis of salivary steroids and protein. *J Clin Lab Anal* 2008;22:395-402.
32. Aygen B, Inan M, Doganay M, Kelestimur F. Adrenal functions in patients with sepsis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997;105:182-186.
33. Baid SK, Sinaii N, Wade M, Rubino D, Nieman LK. Radioimmunoassay and tandem mass spectrometry measurement of bedtime salivary cortisol levels: a comparison of assays to establish hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3102-3107.
34. Barbot O, Cervoni JP, Thevenot T, Richou C, Vanlemmens C, Di Martino V. The CRP level is a good predictor of mortality independent of Pugh or MELD scores in patients with end-stage liver disease (ESLD). *J Hepatol* 2008;48 (Suppl 1):S110.
35. Barlow NL, Holme J, Stockley RA, Clark PM. An evaluation of measured and calculated serum free cortisol in a group of patients with known adrenal suppression. *Ann Clin Biochem* 2010;47:200-204.
36. Bartalena L, Hammond GL, Farsetti A, Flink IL, Robbins J. Interleukin-6 inhibits corticosteroid-binding globulin synthesis by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. *Endocrinology* 1993;133:291-296.
37. Beishuizen A, Thijs LG, Haanen C, Vermes I. Macrophage migration inhibitory factor and hypothalamo-pituitary-adrenal function during critical illness. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2811-2816.
38. Beishuizen A, Thijs LG, Vermes I. Patterns of corticosteroid-binding globulin and the free cortisol index during septic shock and multitrauma. *Intensive Care Med* 2001;27:1584-1591.
39. Beishuizen A, van Lijf JH, Lekkerkerker JF, Vermes I. The low dose (1 microg) ACTH stimulation test for assessment of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neth J Med* 2000;56:91-99.
40. Bellissant E, Annane D. Effect of hydrocortisone on phenylephrine--mean arterial pressure dose-response relationship in septic shock. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:293-303.
41. Bellot P, Garcia-Pagan JC, Frances R, Abalde JG, Navasa M, Perez-Mateo M, Such J, *et al.* Bacterial DNA translocation is associated with systemic circulatory abnormalities and intrahepatic endothelial dysfunction in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2010;52:2044-2052.

42. Berneis K, Staub JJ, Gessler A, Meier C, Girard J, Muller B. Combined stimulation of adrenocorticotropin and compound-S by single dose metyrapone test as an outpatient procedure to assess hypothalamic-pituitary-adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5470-5475.
43. Bernier J, Jobin N, Emptoz-Bonneton A, Pugeat MM, Garrel DR. Decreased corticosteroid-binding globulin in burn patients: relationship with interleukin-6 and fat in nutritional support. *Crit Care Med* 1998;26:452-460.
44. Berthiaume M, Laplante M, Festuccia W, Gelinas Y, Poulin S, Lalonde J, Joannis DR, *et al.* Depot-specific modulation of rat intraabdominal adipose tissue lipid metabolism by pharmacological inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Endocrinology* 2007;148:2391-2397.
45. Biedl A. *The Internal Secretary Organs, their Physiology and Pathology.* 1912.
46. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-310.
47. Bobadilla M, Sifuentes J, Garcia-Tsao G. Improved method for bacteriological diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Clin Microbiol* 1989;27:2145-2147.
48. Bollaert PE, Fieux F, Charpentier C, Levy B. Baseline cortisol levels, cortisol response to corticotropin, and prognosis in late septic shock. *Shock* 2003;19:13-15.
49. Bolland MJ, Chiu WW, Davidson JS, Croxson MS. Heterophile antibodies may cause falsely lowered serum cortisol values. *J Endocrinol Invest* 2005;28:643-645.
50. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987;317:653-658.
51. Bonnel AR, Bunchorntavakul C, Reddy KR. *Immune Dysfunction and Infections in Patients With Cirrhosis.* Clin Gastroenterol Hepatol 2011.
52. Bonte HA, van den Hoven RJ, van der Sluijs Veer G, Vermes I. The use of free cortisol index for laboratory assessment of pituitary-adrenal function. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:127-132.
53. Borkowski AJ, Levin S, Delcroix C, Mahler A, Verhas V. Blood cholesterol and hydrocortisone production in man: quantitative aspects of the utilization of circulating cholesterol by the adrenals at rest and under adrenocorticotropin stimulation. *J Clin Invest* 1967;46:797-811.
54. Bornstein SR, Chrousos GP. Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1729-1736.
55. Bosch J, Abraldes JG, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2010;53:558-567.
56. Bosetti C, Levi F, Lucchini F, Zatonski WA, Negri E, La Vecchia C. Worldwide mortality from cirrhosis: an update to 2002. *J Hepatol* 2007;46:827-839.



57. Bota DP, Van Nuffelen M, Zakariah AN, Vincent JL. Serum levels of C-reactive protein and procalcitonin in critically ill patients with cirrhosis of the liver. *J Lab Clin Med* 2005;146:347-351.
58. Bouachour G, Roy PM, Guiraud MP. The repetitive short corticotropin stimulation test in patients with septic shock. *Ann Intern Med* 1995;123:962-963.
59. Bouachour G, Tirot P, Gouello JP, Mathieu E, Vincent JF, Alquier P. Adrenocortical function during septic shock. *Intensive Care Med* 1995;21:57-62.
60. Bouachour G, Tirot P, Varache N, Gouello JP, Harry P, Alquier P. Hemodynamic changes in acute adrenal insufficiency. *Intensive Care Med* 1994;20:138-141.
61. Braams R, Koppeschaar HP, van de Pavoordt HD, van Vroonhoven TJ. Adrenocortical function in patients with ruptured aneurysm of the abdominal aorta. *Intensive Care Med* 1998;24:124-127.
62. Briegel J, Schelling G, Haller M, Mraz W, Forst H, Peter K. A comparison of the adrenocortical response during septic shock and after complete recovery. *Intensive Care Med* 1996;22:894-899.
63. Brien TG. Human corticosteroid binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1981;14:193-212.
64. Butani RC, Shaffer RT, Szykowski RD, Weeks BE, Speights LG, Kadakia SC. Rapid diagnosis of infected ascitic fluid using leukocyte esterase dipstick testing. *Am J Gastroenterol* 2004;99:532-537.
65. Byl B, Roucloux I, Crusiaux A, Dupont E, Deviere J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. *Gastroenterology* 1993;104:1492-1497.
66. Calandra T, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor: a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. *J Inflamm* 1995;47:39-51.
67. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999;29:664-669.
68. Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993;18:353-358.
69. Campillo B, Richardet JP, Kheo T, Dupeyron C. Nosocomial spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in cirrhotic patients: impact of isolate type on prognosis and characteristics of infection. *Clin Infect Dis* 2002;35:1-10.
70. Carbonell N, Pauwels A, Serfaty L, Fourdan O, Levy VG, Poupon R. Improved survival after variceal bleeding in patients with cirrhosis over the past two decades. *Hepatology* 2004;40:652-659.
71. Carroll T, Raff H, Findling JW. Late-night salivary cortisol measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4:344-350.
72. Castelli GP, Pognani C, Meisner M, Stuardi A, Bellomi D, Sgarbi L. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Crit Care* 2004;8:R234-242.

73. Castellote J, Lopez C, Gornals J, Tremosa G, Farina ER, Baliellas C, Domingo A, *et al.* Rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis by use of reagent strips. *Hepatology* 2003;37:893-896.
74. Cazzaniga M, Dionigi E, Gobbo G, Fioretti A, Monti V, Salerno F. The systemic inflammatory response syndrome in cirrhotic patients: relationship with their in-hospital outcome. *J Hepatol* 2009;51:475-482.
75. Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998;28:1187-1190.
76. Chauveau P, Level C, Lasseur C, Bonarek H, Peuchant E, Montaudon D, Vendrely B, *et al.* C-reactive protein and procalcitonin as markers of mortality in hemodialysis patients: a 2-year prospective study. *J Ren Nutr* 2003;13:137-143.
77. Chesta J, Defilippi C, Defilippi C. Abnormalities in proximal small bowel motility in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1993;17:828-832.
78. Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. *Major Probl Clin Surg* 1964;1:1-85.
79. Chinnock B, Afarian H, Minnigan H, Butler J, Hendey GW. Physician clinical impression does not rule out spontaneous bacterial peritonitis in patients undergoing emergency department paracentesis. *Ann Emerg Med* 2008;52:268-273.
80. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999;274:10689-10692.
81. Christ-Crain M, Stolz D, Jutla S, Couppis O, Muller C, Bingisser R, Schuetz P, *et al.* Free and total cortisol levels as predictors of severity and outcome in community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:913-920.
82. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995;332:1351-1362.
83. Chrousos GP, Charmandari E, Kino T. Glucocorticoid action networks--an introduction to systems biology. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:563-564.
84. Cicognani C, Malavolti M, Morselli-Labate AM, Zamboni L, Sama C, Barbara L. Serum lipid and lipoprotein patterns in patients with liver cirrhosis and chronic active hepatitis. *Arch Intern Med* 1997;157:792-796.
85. Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, Fuster J, *et al.* Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001;34:32-37.
86. Clark PM, Neylon I, Raggatt PR, Sheppard MC, Stewart PM. Defining the normal cortisol response to the short Synacthen test: implications for the investigation of hypothalamic-pituitary disorders. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49:287-292.
87. Cohen J, Venkatesh B. Relative adrenal insufficiency in the intensive care population; background and critical appraisal of the evidence. *Anaesth Intensive Care* 2010;38:425-436.

88. Cohen J, Venkatesh B, Galligan J, Thomas P. Salivary cortisol concentration in the intensive care population: correlation with plasma cortisol values. *Anaesth Intensive Care* 2004;32:843-845.
89. Collins S, Caron MG, Lefkowitz RJ. Beta-adrenergic receptors in hamster smooth muscle cells are transcriptionally regulated by glucocorticoids. *J Biol Chem* 1988;263:9067-9070.
90. Coolens JL, Van Baelen H, Heyns W. Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin. *J Steroid Biochem* 1987;26:197-202.
91. Cooper MS, Bujalska I, Rabbitt E, Walker EA, Bland R, Sheppard MC, Hewison M, *et al.* Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes by proinflammatory cytokines in osteoblasts: an autocrine switch from glucocorticoid inactivation to activation. *J Bone Miner Res* 2001;16:1037-1044.
92. Cooper MS, Stewart PM. Corticosteroid insufficiency in acutely ill patients. *N Engl J Med* 2003;348:727-734.
93. Cordido F, Alvarez-Castro P, Isidro ML, Casanueva FF, Dieguez C. Comparison between insulin tolerance test, growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH), GHRH plus acipimox and GHRH plus GH-releasing peptide-6 for the diagnosis of adult GH deficiency in normal subjects, obese and hypopituitary patients. *Eur J Endocrinol* 2003;149:117-122.
94. Cronin L, Cook DJ, Carlet J, Heyland DK, King D, Lansang MA, Fisher CJ, Jr. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995;23:1430-1439.
95. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: a systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217-231.
96. Dalin AM, Magnusson U, Haggendal J, Nyberg L. The effect of thiopentone-sodium anesthesia and surgery, relocation, grouping, and hydrocortisone treatment on the blood levels of cortisol, corticosteroid-binding globulin, and catecholamines in pigs. *J Anim Sci* 1993;71:1902-1909.
97. De Gottardi A, Thevenot T, Spahr L, Morard I, Bresson-Hadni S, Torres F, Giostra E, *et al.* Risk of complications after abdominal paracentesis in cirrhotic patients: a prospective study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:906-909.
98. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008;36:296-327.
99. Deville WL, Yzermans JC, van Duijn NP, Bezemer PD, van der Windt DA, Bouter LM. The urine dipstick test useful to rule out infections. A meta-analysis of the accuracy. *BMC Urol* 2004;4:4.
100. Dhillon WS, Kong WM, Le Roux CW, Alaghband-Zadeh J, Jones J, Carter G, Mendoza N, *et al.* Cortisol-binding globulin is important in the interpretation of dynamic tests of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis. *Eur J Endocrinol* 2002;146:231-235.

101. Dickstein G, Shechner C, Nicholson WE, Rosner I, Shen-Orr Z, Adawi F, Lahav M. Adrenocorticotropin stimulation test: effects of basal cortisol level, time of day, and suggested new sensitive low dose test. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:773-778.
102. Dimopoulou I, Ilias I, Roussou P, Gavala A, Malefaki A, Milou E, Pitaridis M, *et al.* Adrenal function in non-septic long-stay critically ill patients: evaluation with the low-dose (1 micro g) corticotropin stimulation test. *Intensive Care Med* 2002;28:1168-1171.
103. Dimopoulou I, Tsagarakis S, Douka E, Zervou M, Kouyialis AT, Dafni U, Thalassinou N, *et al.* The low-dose corticotropin stimulation test in acute traumatic and non-traumatic brain injury: incidence of hypo-responsiveness and relationship to outcome. *Intensive Care Med* 2004;30:1216-1219.
104. Dobrin A, Richou C, Thevenot T, Doras I, Monnet E, Cervoni JP, Dupont-Gossart AC, *et al.* Impact pronostique du dépistage systématique du carcinome hépatocellulaire : étude rétrospective d'une cohorte hospitalière de 229 patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2009;33:A74.
105. Dolomie-Fagour L, Corcuff JB. [Is free plasmatic cortisol measurement useful in intensive care unit?]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2008;66:31-41.
106. Dorin RI, Kearns PJ. High output circulatory failure in acute adrenal insufficiency. *Crit Care Med* 1988;16:296-297.
107. Dorin RI, Pai HK, Ho JT, Lewis JG, Torpy DJ, Urban FK, 3rd, Qualls CR. Validation of a simple method of estimating plasma free cortisol: role of cortisol binding to albumin. *Clin Biochem* 2009;42:64-71.
108. Druce LA, Thorpe CM, Wilton A. Mineralocorticoid effects due to cortisol inactivation overload explain the beneficial use of hydrocortisone in septic shock. *Med Hypotheses* 2008;70:56-60.
109. Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;53:58-68.
110. Emptoz-Bonneton A, Crave JC, LeJeune H, Brebant C, Pugeat M. Corticosteroid-binding globulin synthesis regulation by cytokines and glucocorticoids in human hepatoblastoma-derived (HepG2) cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3758-3762.
111. Escher G, Galli I, Vishwanath BS, Frey BM, Frey FJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta enhance the cortisone/cortisol shuttle. *J Exp Med* 1997;186:189-198.
112. Evans LT, Kim WR, Poterucha JJ, Kamath PS. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology* 2003;37:897-901.
113. Evans MJ, Livesey JH, Ellis MJ, Yandle TG. Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones. *Clin Biochem* 2001;34:107-112.
114. Fasolato S, Angeli P, Dallagnese L, Maresio G, Zola E, Mazza E, Salinas F, *et al.* Renal failure and bacterial infections in patients with cirrhosis: epidemiology and clinical features. *Hepatology* 2007;45:223-229.

115. Fede G, Spadaro L, Tomaselli T, Privitera G, Piro S, Rabuazzo AM, Sigalas A, *et al.* Assessment of adrenocortical reserve in stable patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2011;54:243-250.
116. Fellows IW, Byrne AJ, Allison SP. Adrenocortical suppression with etomidate. *Lancet* 1983;2:54-55.
117. Fernandez J, Escorsell A, Zabalza M, Felipe V, Navasa M, Mas A, Lacy AM, *et al.* Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis and septic shock: Effect of treatment with hydrocortisone on survival. *Hepatology* 2006;44:1288-1295.
118. Fernandez J, Navasa M, Gomez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodes J. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002;35:140-148.
119. Finlay WE, McKee JI. Serum cortisol levels in severely stressed patients. *Lancet* 1982;1:1414-1415.
120. Fleming KM, Aithal GP, Solaymani-Dodaran M, Card TR, West J. Incidence and prevalence of cirrhosis in the United Kingdom, 1992-2001: a general population-based study. *J Hepatol* 2008;49:732-738.
121. Frances R, Munoz C, Zapater P, Uceda F, Gascon I, Pascual S, Perez-Mateo M, *et al.* Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut* 2004;53:860-864.
122. Franchimont D, Martens H, Hagelstein MT, Louis E, Dewe W, Chrousos GP, Belaiche J, *et al.* Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2834-2839.
123. Frey FJ. Impaired 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase contributes to renal sodium avidity in cirrhosis: hypothesis or fact? *Hepatology* 2006;44:795-801.
124. Galbois A, Rudler M, Massard J, Fulla Y, Bennani A, Bonnefont-Rousselot D, Thibault V, *et al.* Assessment of adrenal function in cirrhotic patients: salivary cortisol should be preferred. *J Hepatol* 2010;52:839-845.
125. Gann PH, Giovanazzi S, Van Horn L, Branning A, Chatterton RT, Jr. Saliva as a medium for investigating intra- and interindividual differences in sex hormone levels in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:59-64.
126. Garcia-Tsao G. Current management of the complications of cirrhosis and portal hypertension: variceal hemorrhage, ascites, and spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 2001;120:726-748.
127. Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:353-372.
128. Garde AH, Hansen AM. Long-term stability of salivary cortisol. *Scand J Clin Lab Invest* 2005;65:433-436.

129. Garrel DR, Razi M, Lariviere F, Jobin N, Naman N, Emptoz-Bonneton A, Pugeat MM. Improved clinical status and length of care with low-fat nutrition support in burn patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1995;19:482-491.
130. Gilani N, Patel N, Gerkin RD, Ramirez FC, Tharalson EE, Patel K. The safety and feasibility of large volume paracentesis performed by an experienced nurse practitioner. *Ann Hepatol* 2009;8:359-363.
131. Gines P, Quintero E, Arroyo V, Teres J, Bruguera M, Rimola A, Caballeria J, *et al.* Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology* 1987;7:122-128.
132. Grabau CM, Crago SF, Hoff LK, Simon JA, Melton CA, Ott BJ, Kamath PS. Performance standards for therapeutic abdominal paracentesis. *Hepatology* 2004;40:484-488.
133. Graybeal ML, Fang VS. Physiological dosing of exogenous ACTH. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985;108:401-406.
134. Grinspoon SK, Biller BM. Clinical review 62: Laboratory assessment of adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:923-931.
135. Groschl M, Kohler H, Topf HG, Rupprecht T, Rauh M. Evaluation of saliva collection devices for the analysis of steroids, peptides and therapeutic drugs. *J Pharm Biomed Anal* 2008;47:478-486.
136. Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation of liver disease 40 years later: pathophysiology and clinical consequences. *Hepatology* 1994;20:1359-1363.
137. Guarner-Argente C, Sanchez E, Vidal S, Roman E, Concepcion M, Poca M, Sanchez D, *et al.* Toll-like receptor 4 D299G polymorphism and the incidence of infections in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:1192-1199.
138. Gulberg V, Gerbes AL, Sauerbruch T, Appenrodt B. Insufficient sensitivity of reagent strips for spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2007;46:1669; author reply 1669-1670.
139. Gustot T, Durand F, Lebrec D, Vincent JL, Moreau R. Severe sepsis in cirrhosis. *Hepatology* 2009;50:2022-2033.
140. Hammond DK, Zhu BT, Wang MY, Ricci MJ, Liehr JG. Cytochrome P450 metabolism of estradiol in hamster liver and kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;145:54-60.
141. Hammond GL, Smith CL, Paterson NA, Sibbald WJ. A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:34-39.
142. Hamrahian AH, Oseni TS, Arafah BM. Measurements of serum free cortisol in critically ill patients. *N Engl J Med* 2004;350:1629-1638.
143. Harry R, Auzinger G, Wendon J. The clinical importance of adrenal insufficiency in acute hepatic dysfunction. *Hepatology* 2002;36:395-402.
144. Harry R, Auzinger G, Wendon J. The effects of supraphysiological doses of corticosteroids in hypotensive liver failure. *Liver Int* 2003;23:71-77.

145. Heiniger CD, Kostadinova RM, Rochat MK, Serra A, Ferrari P, Dick B, Frey BM, *et al.* Hypoxia causes down-regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by induction of Egr-1. *Faseb J* 2003;17:917-919.
146. Hermanowski-Vosatka A, Balkovec JM, Cheng K, Chen HY, Hernandez M, Koo GC, Le Grand CB, *et al.* 11beta-HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice. *J Exp Med* 2005;202:517-527.
147. Ho JT, Al-Musalhi H, Chapman MJ, Quach T, Thomas PD, Bagley CJ, Lewis JG, *et al.* Septic shock and sepsis: a comparison of total and free plasma cortisol levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:105-114.
148. Huang W, Kalhorn TF, Baillie M, Shen DD, Thummel KE. Determination of free and total cortisol in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2007;29:215-224.
149. Izumi S, Hughes RD, Langley PG, Pernambuco JR, Williams R. Extent of the acute phase response in fulminant hepatic failure. *Gut* 1994;35:982-986.
150. Jaattela M, Ilvesmaki V, Voutilainen R, Stenman UH, Saksela E. Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 1991;128:623-629.
151. Jeffries MA, Stern MA, Gunaratnam NT, Fontana RJ. Unsuspected infection is infrequent in asymptomatic outpatients with refractory ascites undergoing therapeutic paracentesis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2972-2976.
152. Jepsen P, Ott P, Andersen PK, Sorensen HT, Vilstrup H. Clinical course of alcoholic liver cirrhosis: a Danish population-based cohort study. *Hepatology* 2010;51:1675-1682.
153. Joels M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:459-466.
154. Jurney TH, Cockrell JL, Jr., Lindberg JS, Lamiell JM, Wade CE. Spectrum of serum cortisol response to ACTH in ICU patients. Correlation with degree of illness and mortality. *Chest* 1987;92:292-295.
155. Katan M, Christ-Crain M. The stress hormone copeptin: a new prognostic biomarker in acute illness. *Swiss Med Wkly* 2010;140:w13101.
156. Katan M, Morgenthaler N, Widmer I, Puder JJ, Konig C, Muller B, Christ-Crain M. Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, correlates with the individual stress level. *Neuro Endocrinol Lett* 2008;29:341-346.
157. Kazlauskaitė R, Evans AT, Villabona CV, Abdu TA, Ambrosi B, Atkinson AB, Choi CH, *et al.* Corticotropin tests for hypothalamic-pituitary- adrenal insufficiency: a metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4245-4253.
158. Keh D, Boehnke T, Weber-Cartens S, Schulz C, Ahlers O, Bercker S, Volk HD, *et al.* Immunologic and hemodynamic effects of "low-dose" hydrocortisone in septic shock: a double-



- blind, randomized, placebo-controlled, crossover study. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:512-520.
159. Kidd S, Midgley P, Lone N, Wallace AM, Nicol M, Smith J, McIntosh N. A re-investigation of saliva collection procedures that highlights the risk of potential positive interference in cortisol immunoassay. *Steroids* 2009;74:666-668.
  160. Kirkman S, Nelson DH. Alcohol-induced pseudo-Cushing's disease: a study of prevalence with review of the literature. *Metabolism* 1988;37:390-394.
  161. Kloeckner M, Gallet de Saint-Aurin R, Polito A, Aboab J, Annane D. [Corticotropic axis in septic shock]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2007;68:281-289.
  162. Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999;11:13-18.
  163. Koulaouzidis A. Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis: An update on leucocyte esterase reagent strips. *World J Gastroenterol* 2011;17:1091-1094.
  164. Kozyra EF, Wax RS, Burry LD. Can 1 microg of cosyntropin be used to evaluate adrenal insufficiency in critically ill patients? *Ann Pharmacother* 2005;39:691-698.
  165. Kurt M. Deleterious effects of beta-blockers on survival in patients with cirrhosis and refractory ascites. *Hepatology* 2011;53:1411-1412.
  166. Lamberts SW, Bruining HA, de Jong FH. Corticosteroid therapy in severe illness. *N Engl J Med* 1997;337:1285-1292.
  167. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:216-229.
  168. Lanz B, Kadereit B, Ernst S, Shojaati K, Causevic M, Frey BM, Frey FJ, *et al.* Angiotensin II regulates 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 via AT2 receptors. *Kidney Int* 2003;64:970-977.
  169. Lavrentieva A, Kontakiotis T, Lazaridis L, Tsotsolis N, Koumis J, Kyriazis G, Bitzani M. Inflammatory markers in patients with severe burn injury. What is the best indicator of sepsis? *Burns* 2007;33:189-194.
  170. le Roux CW, Chapman GA, Kong WM, Dhillo WS, Jones J, Alaghband-Zadeh J. Free cortisol index is better than serum total cortisol in determining hypothalamic-pituitary-adrenal status in patients undergoing surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2045-2048.
  171. le Roux CW, Sivakumaran S, Alaghband-Zadeh J, Dhillo W, Kong WM, Wheeler MJ. Free cortisol index as a surrogate marker for serum free cortisol. *Ann Clin Biochem* 2002;39:406-408.
  172. Ledingham IM, Watt I. Influence of sedation on mortality in critically ill multiple trauma patients. *Lancet* 1983;1:1270.
  173. Lewis JG. Steroid analysis in saliva: an overview. *Clin Biochem Rev* 2006;27:139-146.
  174. Lewis JG, Bagley CJ, Elder PA, Bachmann AW, Torpy DJ. Plasma free cortisol fraction reflects levels of functioning corticosteroid-binding globulin. *Clin Chim Acta* 2005;359:189-194.

175. Lin RS, Lee FY, Lee SD, Tsai YT, Lin HC, Lu RH, Hsu WC, *et al.* Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation. *J Hepatol* 1995;22:165-172.
176. Llach J, Gines P, Arroyo V, Rimola A, Tito L, Badalamenti S, Jimenez W, *et al.* Prognostic value of arterial pressure, endogenous vasoactive systems, and renal function in cirrhotic patients admitted to the hospital for the treatment of ascites. *Gastroenterology* 1988;94:482-487.
177. Llovet JM, Planas R, Morillas R, Quer JC, Cabre E, Boix J, Humbert P, *et al.* Short-term prognosis of cirrhotics with spontaneous bacterial peritonitis: multivariate study. *Am J Gastroenterol* 1993;88:388-392.
178. Loisa P, Uusaro A, Ruokonen E. A single adrenocorticotrophic hormone stimulation test does not reveal adrenal insufficiency in septic shock. *Anesth Analg* 2005;101:1792-1798.
179. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002;162:1028-1032.
180. Luca A, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Feu F, Jimenez W, Gines A, Fernandez M, *et al.* Beneficial effects of intravenous albumin infusion on the hemodynamic and humoral changes after total paracentesis. *Hepatology* 1995;22:753-758.
181. Malerba G, Romano-Girard F, Cravoisy A, Dousset B, Nace L, Levy B, Bollaert PE. Risk factors of relative adrenocortical deficiency in intensive care patients needing mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 2005;31:388-392.
182. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2000;31:864-871.
183. Mallory A, Schaefer JW. Complications of diagnostic paracentesis in patients with liver disease. *Jama* 1978;239:628-630.
184. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, Vierling JM. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010;51:2193-2213.
185. Marik PE. Adrenal-exhaustion syndrome in patients with liver disease. *Intensive Care Med* 2006;32:275-280.
186. Marik PE, Gayowski T, Starzl TE. The hepatoadrenal syndrome: a common yet unrecognized clinical condition. *Crit Care Med* 2005;33:1254-1259.
187. Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Arlt W, Keh D, *et al.* Recommendations for the diagnosis and management of corticosteroid insufficiency in critically ill adult patients: consensus statements from an international task force by the American College of Critical Care Medicine. *Crit Care Med* 2008;36:1937-1949.
188. Marik PE, Zaloga GP. Adrenal insufficiency during septic shock. *Crit Care Med* 2003;31:141-145.

189. Marik PE, Zaloga GP. Adrenal insufficiency in the critically ill: a new look at an old problem. *Chest* 2002;122:1784-1796.
190. Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1690-1694.
191. Mathurin P. The use of corticosteroids in severe alcohol hepatitis: we need to look beyond this controversy. *J Hepatol* 2010;53:392-393.
192. McDonald JA, Handelsman DJ, Dilworth P, Conway AJ, McCaughan GW. Hypothalamic-pituitary adrenal function in end-stage non-alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1993;8:247-253.
193. McVay PA, Toy PT. Lack of increased bleeding after paracentesis and thoracentesis in patients with mild coagulation abnormalities. *Transfusion* 1991;31:164-171.
194. Melby JC, Spink WW. Comparative studies on adrenal cortical function and cortisol metabolism in healthy adults and in patients with shock due to infection. *J Clin Invest* 1958;37:1791-1798.
195. Mendler MH, Agarwal A, Trimzi M, Madrigal E, Tsushima M, Joo E, Santiago M, *et al.* A new highly sensitive point of care screen for spontaneous bacterial peritonitis using the leukocyte esterase method. *J Hepatol* 2010;53:477-483.
196. Menetrier P, Duval R. Peritonite à pneumocoques à forme ascitique chez une malade atteinte de cirrhose atrophique. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 1906;22:208.
197. Minocha A. A fatal case of paracentesis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:856.
198. Mishra SK, Gupta N, Goswami R. Plasma adrenocorticotropin (ACTH) values and cortisol response to 250 and 1 microg ACTH stimulation in patients with hyperthyroidism before and after carbimazole therapy: case-control comparative study. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1693-1696.
199. Molijn GJ, Spek JJ, van Uffelen JC, de Jong FH, Brinkmann AO, Bruining HA, Lamberts SW, *et al.* Differential adaptation of glucocorticoid sensitivity of peripheral blood mononuclear leukocytes in patients with sepsis or septic shock. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1799-1803.
200. Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F, Angeli P, *et al.* The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology* 2003;38:258-266.
201. Moosa AA, Quortum HA, Ibrahim MD. Rapid diagnosis of bacterial meningitis with reagent strips. *Lancet* 1995;345:1290-1291.
202. Moran JL, Chapman MJ, O'Fathartaigh MS, Peisach AR, Pannall PR, Leppard P. Hypocortisolaemia and adrenocortical responsiveness at onset of septic shock. *Intensive Care Med* 1994;20:489-495.
203. Moreau R, Hadengue A, Soupison T, Kirstetter P, Mamzer MF, Vanjak D, Vauquelin P, *et al.* Septic shock in patients with cirrhosis: hemodynamic and metabolic characteristics and intensive care unit outcome. *Crit Care Med* 1992;20:746-750.

204. Morgenthaler NG, Struck J, Alonso C, Bergmann A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. *Clin Chem* 2006;52:112-119.
205. Mueller UW, Potter JM. Binding of cortisol to human albumin and serum: the effect of protein concentration. *Biochem Pharmacol* 1981;30:727-733.
206. Muller B. Endocrine aspects of critical illness. *Ann Endocrinol (Paris)* 2007;68:290-298.
207. Naito Y, Tamai S, Shingu K, Shindo K, Matsui T, Segawa H, Nakai Y, *et al.* Responses of plasma adrenocorticotrophic hormone, cortisol, and cytokines during and after upper abdominal surgery. *Anesthesiology* 1992;77:426-431.
208. Nasrallah MP, Arafah BM. The value of dehydroepiandrosterone sulfate measurements in the assessment of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5293-5298.
209. Navasa M, Follo A, Llovet JM, Clemente G, Vargas V, Rimola A, Marco F, *et al.* Randomized, comparative study of oral ofloxacin versus intravenous cefotaxime in spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1996;111:1011-1017.
210. Navasa M, Rimola A, Rodes J. Bacterial infections in liver disease. *Semin Liver Dis* 1997;17:323-333.
211. Naveau S, Perlemuter G, Balian A. [Epidemiology and natural history of cirrhosis]. *Rev Prat* 2005;55:1527-1532.
212. Nguyen-Khac E, Cadranel JF, Thevenot T, Nousbaum JB. Review article: utility of reagent strips in diagnosis of infected ascites in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2008.
213. Nguyen-Khac E, Thevenot T, Capron D, Dharancy S, Paupart T, Thabut D, Tiry C. Are ascitic electrolytes usable in cirrhotic patients? Correlation of sodium, potassium, chloride, urea, and creatinine concentrations in ascitic fluid and blood. *Eur J Intern Med* 2008;19:613-618.
214. Nguyen-Khac E, Thevenot T, Piquet M, Chatelain D, Tramier B, Dewael F, Benferhat S, *et al.* Treatment of severe acute alcoholic hepatitis (AAH) with corticoids plus N-Acetyl Cysteine (C-Nac) versus corticoids (C): A multicentre randomized controlled trial. *Hepatology* 2009;50 (Suppl):346A.
215. Nischalke HD, Berger C, K. A, Thyssen L, Gentemann M, Grünhage F, Lammert F, *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 promotor and intron 2 polymorphisms are associated with increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2011;55:1010-6.
216. Nonami T, Yokoyama I, Iwatsuki S, Starzl TE. The incidence of portal vein thrombosis at liver transplantation. *Hepatology* 1992;16:1195-1198.
217. Nousbaum JB, Cadranel JF, Nahon P, Khac EN, Moreau R, Thevenot T, Silvain C, *et al.* Diagnostic accuracy of the Multistix 8 SG reagent strip in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2007;45:1275-1281.
218. Nunes ML, Vattaut S, Corcuff JB, Rault A, Loiseau H, Gatta B, Valli N, *et al.* Late-night salivary cortisol for diagnosis of overt and subclinical Cushing's syndrome in hospitalized and ambulatory patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:456-462.

219. Nye EJ, Grice JE, Hockings GI, Strakosch CR, Crosbie GV, Walters MM, Torpy DJ, *et al.* The insulin hypoglycemia test: hypoglycemic criteria and reproducibility. *J Neuroendocrinol* 2001;13:524-530.
220. Oelkers W. Adrenal insufficiency. *N Engl J Med* 1996;335:1206-1212.
221. Okuda K, Ohnishi K, Kimura K, Matsutani S, Sumida M, Goto N, Musha H, *et al.* Incidence of portal vein thrombosis in liver cirrhosis. An angiographic study in 708 patients. *Gastroenterology* 1985;89:279-286.
222. Oppert M, Reinicke A, Graf KJ, Barckow D, Frei U, Eckardt KU. Plasma cortisol levels before and during "low-dose" hydrocortisone therapy and their relationship to hemodynamic improvement in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2000;26:1747-1755.
223. Pache I, Bilodeau M. Severe haemorrhage following abdominal paracentesis for ascites in patients with liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:525-529.
224. Park WB, Lee KD, Lee CS, Jang HC, Kim HB, Lee HS, Oh MD, *et al.* Production of C-reactive protein in *Escherichia coli*-infected patients with liver dysfunction due to liver cirrhosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51:227-230.
225. Parker LN, Levin ER, Lirak ET. Evidence for adrenocortical adaptation to severe illness. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:947-952.
226. Path G, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Interleukin-6 and the interleukin-6 receptor in the human adrenal gland: expression and effects on steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2343-2349.
227. Pawlotsky JM. The results of Phase III clinical trials with telaprevir and boceprevir presented at the Liver Meeting 2010: a new standard of care for hepatitis C virus genotype 1 infection, but with issues still pending. *Gastroenterology* 2011;140:746-754.
228. Perrot D, Bonneton A, Dechaud H, Motin J, Pugeat M. Hypercortisolism in septic shock is not suppressible by dexamethasone infusion. *Crit Care Med* 1993;21:396-401.
229. Pfeifer M, Kanc K, Verhovec R, Kocijancic A. Reproducibility of the insulin tolerance test (ITT) for assessment of growth hormone and cortisol secretion in normal and hypopituitary adult men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;54:17-22.
230. Pluta A, Gutkowski K, Hartleb M. Coagulopathy in liver diseases. *Adv Med Sci* 2010;55:16-21.
231. Pugeat M, Bonneton A, Perrot D, Rocle-Nicolas B, Lejeune H, Grenot C, Dechaud H, *et al.* Decreased immunoreactivity and binding activity of corticosteroid-binding globulin in serum in septic shock. *Clin Chem* 1989;35:1675-1679.
232. Rabe C, Schmitz V, Paashaus M, Musch A, Zickermann H, Dumoulin FL, Sauerbruch T, *et al.* Does intubation really equal death in cirrhotic patients? Factors influencing outcome in patients with liver cirrhosis requiring mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 2004;30:1564-1571.
233. Raff H, Brock S, Findling JW. Cosyntropin-stimulated salivary cortisol in hospitalized patients with hypoproteinemia. *Endocrine* 2008;34:68-74.
234. Rantonen PJ, Meurman JH. Viscosity of whole saliva. *Acta Odontol Scand* 1998;56:210-214.

235. Ravaud P, Hudry C, Giraudeau B, Weill B, Dougados M. Rapid diagnosis of inflammatory synovial fluid with reagent strips. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:815-818.
236. Reincke M, Allolio B, Wurth G, Winkelmann W. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness: response to dexamethasone and corticotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:151-156.
237. Rimola A, Garcia-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol* 2000;32:142-153.
238. Riordan FA, Thomson AP, Ratcliffe JM, Sills JA, Diver MJ, Hart CA. Admission cortisol and adrenocorticotrophic hormone levels in children with meningococcal disease: evidence of adrenal insufficiency? *Crit Care Med* 1999;27:2257-2261.
239. Rivers EP, Gaspari M, Saad GA, Mlynarek M, Fath J, Horst HM, Wortsman J. Adrenal insufficiency in high-risk surgical ICU patients. *Chest* 2001;119:889-896.
240. Robbins J, Rall JE. The interaction of thyroid hormones and protein in biological fluids. *Recent Prog Horm Res* 1957;13:161-202; discussion 202-168.
241. Romney R, Mathurin P, Ganne-Carrie N, Halimi C, Medini A, Lemaitre P, Gruaud P, *et al.* Usefulness of routine analysis of ascitic fluid at the time of therapeutic paracentesis in asymptomatic outpatients. Results of a multicenter prospective study. *Gastroenterol Clin Biol* 2005;29:275-279.
242. Rosenbloom AJ, Pinsky MR, Bryant JL, Shin A, Tran T, Whiteside T. Leukocyte activation in the peripheral blood of patients with cirrhosis of the liver and SIRS. Correlation with serum interleukin-6 levels and organ dysfunction. *Jama* 1995;274:58-65.
243. Rosner W. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocr Rev* 1990;11:80-91.
244. Rothwell PM, Udawadia ZF, Lawler PG. Cortisol response to corticotropin and survival in septic shock. *Lancet* 1991;337:582-583.
245. Ruiz-del-Arbol L, Urman J, Fernandez J, Gonzalez M, Navasa M, Monescillo A, Albillos A, *et al.* Systemic, renal, and hepatic hemodynamic derangement in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2003;38:1210-1218.
246. Runyon BA. Management of adult patients with ascites caused by cirrhosis. *Hepatology* 1998;27:264-272.
247. Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis. *Hepatology* 2004;39:841-856.
248. Runyon BA. Paracentesis of ascitic fluid. A safe procedure. *Arch Intern Med* 1986;146:2259-2261.
249. Runyon BA, Canawati HN, Akriviadis EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterology* 1988;95:1351-1355.

250. Runyon BA, McHutchison JG, Antillon MR, Akriviadis EA, Montano AA. Short-course versus long-course antibiotic treatment of spontaneous bacterial peritonitis. A randomized controlled study of 100 patients. *Gastroenterology* 1991;100:1737-1742.
251. Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994;21:792-796.
252. Sakaue M, Hoffman BB. Glucocorticoids induce transcription and expression of the alpha 1B adrenergic receptor gene in DTT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1991;88:385-389.
253. Sam R, Sahani M, Ulozas E, Leehey DJ, Ing TS, Gandhi VC. Utility of a peritoneal dialysis leukocyte test strip in the diagnosis of peritonitis. *Artif Organs* 2002;26:546-548.
254. Sam S, Corbridge TC, Mokhesi B, Comellas AP, Molitch ME. Cortisol levels and mortality in severe sepsis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:29-35.
255. Sandberg AA, Slaunwhite WR, Jr. Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma. II. Levels in various conditions and the effects of estrogens. *J Clin Invest* 1959;38:1290-1297.
256. Sapey T, Kabissa D, Fort E, Laurin C, Mendler MH. Instant diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis using leukocyte esterase reagent strips: Nephur-Test vs. MultistixSG. *Liver Int* 2005;25:343-348.
257. Scemama-Clergue J, Doutrelot-Philippon C, Metreau JM, Teisseire B, Capron D, Dhumeaux D. Ascitic fluid pH in alcoholic cirrhosis: a reevaluation of its use in the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 1985;26:332-335.
258. Schmidt IL, Lahner H, Mann K, Petersenn S. Diagnosis of adrenal insufficiency: Evaluation of the corticotropin-releasing hormone test and Basal serum cortisol in comparison to the insulin tolerance test in patients with hypothalamic-pituitary-adrenal disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4193-4198.
259. Schumer W. Steroids in the treatment of clinical septic shock. *Ann Surg* 1976;184:333-341.
260. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem* 1999;36 ( Pt 6):704-721.
261. Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 1936;138:32.
262. Serafini P, Lobo RA. The effects of spironolactone on adrenal steroidogenesis in hirsute women. *Fertil Steril* 1985;44:595-599.
263. Serste T, Melot C, Francoz C, Durand F, Rautou PE, Valla D, Moreau R, *et al.* Deleterious effects of beta-blockers on survival in patients with cirrhosis and refractory ascites. *Hepatology* 2010;52:1017-1022.
264. Sharshar T, Annane D, de la Grandmaison GL, Brouland JP, Hopkinson NS, Francoise G. The neuropathology of septic shock. *Brain Pathol* 2004;14:21-33.
265. Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol* 2004;40:247-254.



266. Shawcross DL, Shabbir SS, Taylor NJ, Hughes RD. Ammonia and the neutrophil in the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 2010;51:1062-1069.
267. Shellman RG, Fulkerson WJ, DeLong E, Piantadosi CA. Prognosis of patients with cirrhosis and chronic liver disease admitted to the medical intensive care unit. *Crit Care Med* 1988;16:671-678.
268. Sibbald WJ, Short A, Cohen MP, Wilson RF. Variations in adrenocortical responsiveness during severe bacterial infections. Unrecognized adrenocortical insufficiency in severe bacterial infections. *Ann Surg* 1977;186:29-33.
269. Siminoski K, Goss P, Drucker DJ. The Cushing syndrome induced by medroxyprogesterone acetate. *Ann Intern Med* 1989;111:758-760.
270. Singh N, Gayowski T, Marino IR, Schlichtig R. Acute adrenal insufficiency in critically ill liver transplant recipients. Implications for diagnosis. *Transplantation* 1995;59:1744-1745.
271. Siraux V, De Backer D, Yalavatti G, Melot C, Gervy C, Mockel J, Vincent JL. Relative adrenal insufficiency in patients with septic shock: comparison of low-dose and conventional corticotropin tests. *Crit Care Med* 2005;33:2479-2486.
272. Sola E, Gines P. Renal and circulatory dysfunction in cirrhosis: current management and future perspectives. *J Hepatol* 2010;53:1135-1145.
273. Soni A, Pepper GM, Wyrwinski PM, Ramirez NE, Simon R, Pina T, Gruenspan H, *et al.* Adrenal insufficiency occurring during septic shock: incidence, outcome, and relationship to peripheral cytokine levels. *Am J Med* 1995;98:266-271.
274. Sort P, Navasa M, Arroyo V, Aldeguer X, Planas R, Ruiz-del-Arbol L, Castells L, *et al.* Effect of intravenous albumin on renal impairment and mortality in patients with cirrhosis and spontaneous bacterial peritonitis. *N Engl J Med* 1999;341:403-409.
275. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, *et al.* Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* 2008;358:111-124.
276. Stewart PM, Burra P, Shackleton CH, Sheppard MC, Elias E. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency and glucocorticoid status in patients with alcoholic and non-alcoholic chronic liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:748-751.
277. Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, is elevated in serum of sepsis patients. *Peptides* 2005;26:2500-2504.
278. Suzuki S, Tsubochi H, Ishibashi H, Matsuda Y, Suzuki T, Krozowski ZS, Sasano H, *et al.* Inflammatory mediators down-regulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in a human lung epithelial cell line BEAS-2B and the rat lung. *Tohoku J Exp Med* 2005;207:293-301.
279. Swain MG, Appleyard C, Wallace J, Wong H, Le T. Endogenous glucocorticoids released during acute toxic liver injury enhance hepatic IL-10 synthesis and release. *Am J Physiol* 1999;276:G199-205.

280. Swingle WW, Davanzo JP, Crossfield HC, Glenister D, Osborn M, Rowen R, Wagle G. Glucocorticoids and maintenance of blood pressure and plasma volume of adrenalectomized dogs subjected to stress. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959;100:617-622.
281. Tan T, Chang L, Woodward A, McWhinney B, Galligan J, Macdonald GA, Cohen J, *et al.* Characterising adrenal function using directly measured plasma free cortisol in stable severe liver disease. *J Hepatol* 2010;53:841-848.
282. Tandon P, Garcia-Tsao G. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008;28:26-42.
283. Taylor KM, Bain WH, Jones JV, Walker MS. The effect of hemodilution on plasma levels of cortisol and free cortisol. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1976;72:57-61.
284. Tazi KA, Quioc JJ, Saada V, Bezeaud A, Lebrec D, Moreau R. Upregulation of TNF-alpha production signaling pathways in monocytes from patients with advanced cirrhosis: possible role of Akt and IRAK-M. *J Hepatol* 2006;45:280-289.
285. Terra C, Guevara M, Torre A, Gilabert R, Fernandez J, Martin-Llahi M, Baccaro ME, *et al.* Renal failure in patients with cirrhosis and sepsis unrelated to spontaneous bacterial peritonitis: value of MELD score. *Gastroenterology* 2005;129:1944-1953.
286. Thabut D, Massard J, Gangloff A, Carbonell N, Francoz C, Nguyen-Khac E, Duhamel C, *et al.* Model for end-stage liver disease score and systemic inflammatory response are major prognostic factors in patients with cirrhosis and acute functional renal failure. *Hepatology* 2007;46:1872-1882.
287. Thabut D, Shah V. Intrahepatic angiogenesis and sinusoidal remodeling in chronic liver disease: new targets for the treatment of portal hypertension? *J Hepatol* 2010;53:976-980.
288. Thevenot T, Borot S, Remy-Martin A, Sapin R, Cervoni JP, Richou C, Vanlemmens C, *et al.* Assessment of adrenal function in cirrhotic patients using concentration of serum-free and salivary cortisol. *Liver Int* 2011;31:425-433.
289. Thevenot T, Borot S, Remy-Martin A, Sapin R, Penfornis A, Di Martino V, Monnet E. Assessing adrenal function in cirrhotic patients: is there a reliable test? *Gastroenterol Clin Biol* 2009;33:584-588.
290. Thevenot T, Cadranel JF, Nguyen-Khac E, Tilmant L, Tiry C, Welty S, Merzoug N. Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients by use of two reagent strips. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:579-583.
291. Thevenot T, Cervoni JP, Di Martino V. [Beta-blockers in portal hypertension: Unexpected limitations!]. *Presse Med* 2010;40:227-229.
292. Thevenot T, Cervoni JP, Monnet E, Sheppard F, Martino VD. Is this really the end of beta-blockers in patients with cirrhosis and refractory ascites? *Hepatology* 2010;53:715-716.
293. Thevenot T, Degano B, Briquez C, Sztrymf B, Seronde MF, Rival G, Di Martino V, *et al.* L'hypertension porto-pulmonaire. *Hepato Gastro* 2011;18:378-90.

294. Thevenot T, Pastor CM, Cervoni JP, Jacquelinet C, Nguyen-Khac E, Richou C, Heyd B, *et al.* [Hepatopulmonary syndrome]. *Gastroenterol Clin Biol* 2009;33:565-579.
295. Thierry S, Giroux Leprieur E, Lecuyer L, Brocas E, Van de Louw A. Echocardiographic features, mortality, and adrenal function in patients with cirrhosis and septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008;52:45-51.
296. Thuluvath PJ, Morss S, Thompson R. Spontaneous bacterial peritonitis--in-hospital mortality, predictors of survival, and health care costs from 1988 to 1998. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1232-1236.
297. Toledo C, Salmeron JM, Rimola A, Navasa M, Arroyo V, Llach J, Gines A, *et al.* Spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis: predictive factors of infection resolution and survival in patients treated with cefotaxime. *Hepatology* 1993;17:251-257.
298. Tsai MH, Peng YS, Chen YC, Liu NJ, Ho YP, Fang JT, Lien JM, *et al.* Adrenal insufficiency in patients with cirrhosis, severe sepsis and septic shock. *Hepatology* 2006;43:673-681.
299. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 2002;53:865-871.
300. Tsigos C, Papanicolaou DA, Defensor R, Mitsiadis CS, Kyrou I, Chrousos GP. Dose effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. *Neuroendocrinology* 1997;66:54-62.
301. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1999;79:1-71.
302. Udelsman R, Goldstein DS, Loriaux DL, Chrousos GP. Catecholamine-glucocorticoid interactions during surgical stress. *J Surg Res* 1987;43:539-545.
303. Valentino R, Tommaselli AP, Savastano S, Stewart PM, Ghiggi MR, Galletti F, Mariniello P, *et al.* Alcohol inhibits 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat kidney and liver. *Horm Res* 1995;43:176-180.
304. van der Voort PH, Gerritsen RT, Bakker AJ, Boerma EC, Kuiper MA, de Heide L. HDL-cholesterol level and cortisol response to synacthen in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2003;29:2199-2203.
305. Van Thiel DH, Hassanein T, Gurakar A, Wright HI, Caraceni P, De Maria N, Nadir A. Liver transplantation after an acute episode of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatogastroenterology* 1996;43:1584-1588.
306. Vanbiervliet G, Rakotoarisoa C, Filippi J, Guerin O, Calle G, Hastier P, Marine-Barjoan E, *et al.* Diagnostic accuracy of a rapid urine-screening test (Multistix8SG) in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:1257-1260.
307. Vanlemmens C, Di Martino V, Milan C, Messner M, Minello A, Duvoux C, Poynard T, *et al.* Immediate listing for liver transplantation versus standard care for Child-Pugh stage B alcoholic cirrhosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009;150:153-161.

308. Vaughan GM, Becker RA, Allen JP, Goodwin CW, Jr., Pruitt BA, Jr., Mason AD, Jr. Cortisol and corticotrophin in burned patients. *J Trauma* 1982;22:263-273.
309. Venkatesh B, Mortimer RH, Couchman B, Hall J. Evaluation of random plasma cortisol and the low dose corticotropin test as indicators of adrenal secretory capacity in critically ill patients: a prospective study. *Anaesth Intensive Care* 2005;33:201-209.
310. Vermes I, Beishuizen A, Hampsink RM, Haanen C. Dissociation of plasma adrenocorticotropin and cortisol levels in critically ill patients: possible role of endothelin and atrial natriuretic hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1238-1242.
311. Vialard-Miguel J, Belaidi N, Lembeye L, Corcuff JB. Lemon juice alters cortisol assays in saliva. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:478-479.
312. Villeneuve JP, Condreay LD, Willems B, Pomier-Layrargues G, Fenyves D, Bilodeau M, Leduc R, *et al.* Lamivudine treatment for decompensated cirrhosis resulting from chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000;31:207-210.
313. Vincent RP, Etogo-Asse FE, Dew T, Bernal W, Alagband-Zadeh J, le Roux CW. Serum total cortisol and free cortisol index give different information regarding the hypothalamus-pituitary-adrenal axis reserve in patients with liver impairment. *Ann Clin Biochem* 2009;46:505-507.
314. Vining RF, McGinley RA, Symons RG. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem* 1983;29:1752-1756.
315. Vogeser M, Briegel J, Zachoval R. Dialyzable free cortisol after stimulation with Synacthen. *Clin Biochem* 2002;35:539-543.
316. Vogeser M, Mohnle P, Briegel J. Free serum cortisol: quantification applying equilibrium dialysis or ultrafiltration and an automated immunoassay system. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:521-525.
317. Wade M, Baid S, Calis K, Raff H, Sinaii N, Nieman L. Technical details influence the diagnostic accuracy of the 1 microg ACTH stimulation test. *Eur J Endocrinol* 2010;162:109-113.
318. Wagner RL, White PF, Kan PB, Rosenthal MH, Feldman D. Inhibition of adrenal steroidogenesis by the anesthetic etomidate. *N Engl J Med* 1984;310:1415-1421.
319. Walker BR. Is "Cushing's disease of the omentum" an affliction of mouse and men? *Diabetologia* 2004;47:767-769.
320. Wang SS, Lee FY, Chan CC, Lu RH, Chao Y, Lin HC, Wu SL, *et al.* Sequential changes in plasma cytokine and endotoxin levels in cirrhotic patients with bacterial infection. *Clin Sci (Lond)* 2000;98:419-425.
321. Watt I, Ledingham IM. Mortality amongst multiple trauma patients admitted to an intensive therapy unit. *Anaesthesia* 1984;39:973-981.
322. Webster ST, Brown KL, Lucey MR, Nostrant TT. Hemorrhagic complications of large volume abdominal paracentesis. *Am J Gastroenterol* 1996;91:366-368.
323. Wezyk MT, Malafiej E, Makowski A, Woch G. [Bacteriologic evaluation of middle ear fluid during the course of secretory otitis media in children]. *Otolaryngol Pol* 2000;54:541-546.

- 324. Widmer IE, Puder JJ, Konig C, Pargger H, Zerkowski HR, Girard J, Muller B. Cortisol response in relation to the severity of stress and illness. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4579-4586.
- 325. Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999;104:1223-1233.
- 326. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:422-433.
- 327. Wong CL, Holroyd-Leduc J, Thorpe KE, Straus SE. Does this patient have bacterial peritonitis or portal hypertension? How do I perform a paracentesis and analyze the results? *Jama* 2008;299:1166-1178.
- 328. Wood P. Salivary steroid assays - research or routine? *Ann Clin Biochem* 2009;46:183-196.
- 329. Wust S, Van Rossum EF, Federenko IS, Koper JW, Kumsta R, Hellhammer DH. Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:565-573.
- 330. Yaguchi H, Tsutsumi K, Shimono K, Omura M, Sasano H, Nishikawa T. Involvement of high density lipoprotein as substrate cholesterol for steroidogenesis by bovine adrenal fasciculo-reticularis cells. *Life Sci* 1998;62:1387-1395.
- 331. Yan AW, Fouts DE, Brandl J, Starkel P, Torralba M, Schott E, Tsukamoto H, *et al.* Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease. *Hepatology* 2011;53:96-105.
- 332. Yang S, Zhang L. Glucocorticoids and vascular reactivity. *Curr Vasc Pharmacol* 2004;2:1-12.
- 333. Zapater P, Frances R, Gonzalez-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, Monfort D, *et al.* Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology* 2008;48:1924-1931.

# Chapitre 6 : LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

## 6.1) Listes des figures

Figure I : Physiopathologie du développement de l'ascite et implication potentielle du déficit en cortisol dans l'aggravation de l'hypertension portale.....	18
Figure II : Anatomie de la surrénale avec ses différentes zones fonctionnelles. ...	21
Figure III : Les différentes étapes de la synthèse du cortisol .....	22
Figure IV: L'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien.....	23
Figure V : Diagnostic de l'insuffisance surrénale avec le test au Synacthène .....	33
Figure VI : Variation des concentrations de cortisol selon la concentration d'albumine. ....	39
Figure VII : Variation des concentrations du cortisol libre et lié chez le sujet sain et septique, d'après Dorin et al. ....	48
Figure VIII : Mécanismes intriqués participant à l'augmentation du cortisol intracellulaire.....	49
Figure IX: Seuils de cortisol libre définissant l'insuffisance surrénale chez le sujet gravement malade .....	54
Figure X: Pronostic des patients en choc septique selon le delta cortisol et le cortisol basal.....	56
Figure XI : Prévalence de la dysfonction surrénale et taux de mortalité chez des patients ayant une hépatite fulminante, une hépatite aiguë sur une maladie chronique du foie, une transplantation hépatique récente ou depuis plus de 6 mois, d'après Marik et al. [186]. ....	59
Figure XII : Prévalence de la dysfonction surrénale selon le nombre d'organes défaillants. ....	72
Figure XIII: Prévalence de la dysfonction surrénale selon l'état hémodynamique et l'insuffisance rénale initiale.....	72
Figure XIV: Fréquence de la résolution du choc septique dans les groupes « prospectif » (ce groupe a reçu de l'hydrocortisone) et « rétrospectif ».....	74

## 6.2) Listes des tableaux

Tableau I : Principaux médicaments et conditions pathologiques faisant varier les concentrations du cortisol total.....	37
Tableau II : Techniques de séparation et de dosage du cortisol libre. Tableau modifié d'après Dolomie et al. [105]. .....	40
Tableau III: Variation du cortisol total sérique, du cortisol libre sérique et du cortisol salivaire selon l'albuminémie. ....	42
Tableau IV : Estimateurs du cortisol libre, d'après Dolomie et al. [105] .....	47
Tableau V: Prévalence de l'insuffisance surrénale dans le choc septique .....	52
Tableau VI: Etudes ayant évalué la fonction surrénale en cas d'hépatite aiguë...60	
Tableau VII: Etudes prospectives ayant évalué la fonction surrénale chez des patients cirrhotiques stables en utilisant le test à 1 µg ou le test à 250 µg.....	65
Tableau VIII : Etudes prospectives ayant évalué la fonction surrénale chez des patients septiques cirrhotiques avec le test à 250 µg.....	66
Tableau IX: Etudes ayant évalué le cortisol salivaire chez des patients cirrhotiques.....	77
Tableau X: Etudes ayant évalué le cortisol libre sérique chez des patients cirrhotiques.....	78